

TESIS DOCTORAL



* 5 3 0 9 8 4 6 9 8 3 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

✓-53-370822-1

ESTUDIO DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y FUNCIONALES DE LAS FIBRAS MUSCULARES ESTRIADAS ESQUELÉTICAS EN ATLETAS DE ÉLITE

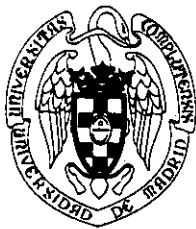
Jacobo López de Rego Martínez
1998



BIBLIOTECA



Estudio de los cambios morfológicos y funcionales de las fibras musculares estriadas esqueléticas en atletas de élite



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA FÍSICA
Y DE REHABILITACIÓN • HIDROLOGÍA MÉDICA

**LUIS PABLO RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, CATEDRÁTICO-DIRECTOR DEL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA FÍSICA Y DE REHABILITACIÓN. HIDROLOGÍA
MÉDICA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,**

CERTIFICA que Don **JACOBO LÓPEZ DE REGO MARTÍNEZ**, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado "**Estudio de los cambios morfológicos y funcionales de las fibras musculares estriadas esqueléticas en atletas de élite**". Este trabajo, tras la revisión de la literatura científica, se ha desarrollado con la metodología apropiada y específica para la resolución de las hipótesis planteadas y los resultados han sido analizados de forma minuciosa y pormenorizada. Se trata de un trabajo original e interesante que reúne todos los requisitos metodológicos para poder ser defendido como Tesis Doctoral y optar al Grado de Doctor en Medicina.

Y para que así conste, lo firmo en Madrid a 21 de septiembre de mil novecientos noventa y ocho

A Reyes

Esta Tesis, que se presenta para optar al Grado de Doctor en Madrid, es un trabajo compartido con numerosas personas. Con ellas he colaborado y aprendido, de una manera u otra, a lo largo de varios años. No desearía olvidar a ninguna de ellas:

** PROF. DR. D. LUIS PABLO RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, Director de la presente Tesis, Director del Dpto. de Medicina Física y Rehabilitación, Facultad de Medicina de la U.C.M.*

** PROF^a. DR^a. D^a. REYES FLORES HERRÁEZ, Dpto. de Biología Celular, Facultad de Medicina de la U.C.M.*

** PROF. DR. D. EDUARDO GARCÍA POBLETE, Dpto. de Biología Celular, Facultad de Medicina de la U.C.M.*

** DR. D. FRANCISCO LEYVA COBIÁN, Servicio de Inmunología del Hospital Universitario "Marqués de Valdecilla". Santander.*

** PROF^a. DR^a. D^a. PILAR SIMÓN HUARTE, Dpto. de Biología Celular, Facultad de Medicina de la U.C.M.*

** Personal Técnico de la Facultad de Medicina: D^a. ADELA PÉREZ VERT, D^a. BELÉN MORENO MENGIBAR y D^a. ISABEL MONTERO CALVO.*

** Personal Técnico del Centro de Microscopía Electrónica "Luis Bru" de la U.C.M.: D. AGUSTÍN FERNÁNDEZ LARIOS y D. EUGENIO BALDONEDO RODRÍGUEZ.*

Y de una forma especial y a modo de pequeño homenaje póstumo al PROF. DR. D. LUIS ZAMORANO SANABRA, por todos los años que dedicó a hacernos profundizar en el estudio de la Histología, derrochando ilusión y fomentando el compañerismo, con esa alegría que le caracterizó. Aparte de su magisterio, debo agradecerle muy especialmente la amistad con la que me honró.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.

1.- TEJIDO MUSCULAR: GENERALIDADES. 2.

2.- MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO. 2.

2.1.- ORGANIZACIÓN MACROSCÓPICA DEL MÚSCULO ESTRIADO. 2.

2.2.- LA CÉLULA MUSCULAR ESTRIADA ESQUELÉTICA. 3.

2.2.1.- Estudio con microscopía óptica. 3.

2.2.2.- Ultraestructura de la célula muscular estriada esquelética. 5.

2.2.2.1.- Núcleos. 5.

2.2.2.2.- Miofibrillas. 6.

2.2.2.2.1.- Composición bioquímica de las miofibrillas. 9.

2.2.2.3.- Sarcolema. 15.

2.2.2.4.- El sarcoplasma y sus componentes. 16.

2.3.- CÉLULAS SATÉLITES. 20.

2.4.- VASCULARIZACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO. 24.

2.5.- INERVACIÓN DEL MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO. 24.

2.5.1.- Unión neuromuscular. 25.

2.5.2.- Huso neuromuscular. 28.

2.6.- TEJIDOS CONECTIVOS DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO. 31.

2.6.1.-Vainas musculares. 31.

2.6.2.-Unión miotendinosa. 31.

2.7.- EMBRIOLOGÍA. 33.

3.- HETEROGENEIDAD DE LAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS EXTRAFUSALES. 38.

3.1.- RECUERDO HISTÓRICO. 38.

3.2.- DIFERENCIACIÓN HISTOQUÍMICA. 39.

3.3.- ESTUDIOS INMUNOCITOQUÍMICOS. 44.

3.4.- VARIACIONES MORFOLÓGICAS EN LOS DIFERENTES TIPOS DE FIBRAS. 48.

3.4.1.- Variaciones en la superficie de corte de la fibra. 48.

3.4.2.- Variaciones en las mitocondrias. 49.

3.4.3.- Variaciones en las miofibrillas. 49.

3.4.4.- Variaciones en el retículo sarcoplásmico. 51.

3.4.5.- Variaciones en la placa motora. 51.

3.4.6.- Variaciones en la vascularización. 55.

4.- FISIOLOGÍA. 56.

4.1.- MECANISMO BÁSICO DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR. 56.

4.2.- PRODUCCIÓN DE ENERGÍA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO. 62.

4.2.1.- Almacenamiento de alta energía. 62.

4.2.2.- Almacenamiento de sustrato energético. 62.

4.3.- PROPIEDADES FÍSICAS DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR. 64.

- 4.3.1.- Propiedades mecánicas. 65.
- 4.3.2.- Tipos de contracción muscular. 66.
- 4.3.3.- Velocidad de contracción. 67.
- 4.3.4.- Rendimiento de la contracción. 67.
- 4.3.5.- Estímulo nervioso. 68.

5.- VARIACIONES EN EL TEJIDO MUSCULAR ESTRIADO ESQUELÉTICO CON EL EJERCICIO. 69.

5.1.- CRECIMIENTO DE LA FIBRA MUSCULAR. 69.

- 5.1.1.- Crecimiento longitudinal de las miofibrillas. 71.
- 5.1.2.- Crecimiento transversal de las miofibrillas. 73.
- 5.1.3.- Variaciones en el retículo sarcoplásmico y sistema T. 76.
- 5.1.4.- Variaciones en la dotación mitocondrial. 77.
- 5.1.5.- Variaciones en la capacidad metabólica de la fibra muscular. 78.

5.2.- CRECIMIENTO DEL TEJIDO CONECTIVO MUSCULAR. 83.

- 5.2.1.- Variaciones en las vainas musculares. 84.
- 5.2.2.- Variaciones en los capilares de la fibra muscular. 85.

5.3.- CAPACITACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS SATÉLITES. 87.

5.4.- CAMBIOS EN EL CONTROL NERVIOSO DE LA UNIDAD MOTORA. 89.

5.5.- POSIBILIDAD DE CAMBIO EN EL TIPO DE DOTACIÓN FIBRILAR DEL MÚSCULO CON EL EJERCICIO. 91.

OBJETIVOS.

6.- OBJETIVOS. 96.

MATERIAL Y MÉTODO.

7.- MUESTRA. 99.

7.1.- SELECCIÓN DE LA MUESTRA. 99.

7.2.- TÉCNICA DE LA BIOPSIA. 101.

- 7.2.1.- Características de la aguja. 101.
- 7.2.2.- Toma de muestras. 101.
- 7.2.3.- Características del músculo vasto externo. 103.

8.- PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS PARA ESTUDIO HISTOLÓGICO. 105.

8.1.- MICROSCOPIA ÓPTICA. 105.

8.2.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA. 105.

9.- PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS PARA ESTUDIO HISTOQUÍMICO. 106.

9.1.- TÉCNICAS ENZIMÁTICAS UTILIZADAS. 106.

9.2.- LOCALIZACIÓN DE LAS POBLACIONES CELULARES EN LOS CORTES HISTOLÓGICOS. 109.

10.- ANÁLISIS DE IMÁGENES, MÉTODO ESTADÍSTICO Y TRATAMIENTO INFORMÁTICO. 110.

RESULTADOS.

11.- VARIACIONES CUALITATIVAS DE LAS FIBRAS MUSCULARES EN RELACIÓN CON EL EJERCICIO FÍSICO. 114.

11.1.- VARIACIONES EN LOS ATLETAS DE RESISTENCIA. GRUPO R21. 114.

11.2.- VARIACIONES EN LOS ATLETAS DE RESISTENCIA. GRUPO R25. 122.

11.3.- VARIACIONES EN LOS ATLETAS DE VELOCIDAD. GRUPO V21. 130.

11.4.- VARIACIONES EN LOS ATLETAS DE VELOCIDAD. GRUPO V25. 137.

12.- ESTUDIO CUANTITATIVO DE LAS VARIACIONES QUE PRESENTA EL MÚSCULO ESQUELÉTICO SEGÚN LA ACTIVIDAD DEPORTIVA. 143.

12.1.- VARIACIONES EN PORCENTAJE DE LOS DISTINTOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES. 143.

12.1.1.- Fibras tipo I. 144.

12.1.2.- Fibras tipo IIa. 145.

12.1.3.- Fibras tipo IIb. 146.

12.1.4.- Fibras IIc. 147.

12.2.- CAMBIOS EN LAS DIMENSIONES DE LA SUPERFICIE MEDIA DE CORTE TRANSVERSAL DE LOS DISTINTOS TIPOS DE FIBRAS. 157.

12.2.1.- Fibras tipo I. 157.

12.2.2.- Fibras tipo IIa. 158.

12.2.3.- Fibras tipo IIb. 159.

12.2.4.- Fibras tipo IIc. 160.

12.3.- VARIACIONES DEL VOLUMEN MITOCONDRIAL EN RELACIÓN AL VOLUMEN DE CADA TIPO DE FIBRA. 166.

12.3.1.- Fibras tipo I. 166.

12.3.2.- Fibras tipo IIa. 167.

12.3.3.- Fibras tipo IIb. 168.

12.3.4.- Fibras tipo IIc. 169.

12.4.- ESTUDIO CUANTITATIVO DE LAS VARIACIONES EN EL NÚMERO DE CAPILARES EN LOS DIFERENTES GRUPOS DEL PROTOCOLO. 176.

DISCUSIÓN.

13.- VALORACIÓN DEL MÉTODO UTILIZADO. 181.

13.1.- EXTRACCIÓN DE MUESTRAS. 181.

13.2.- DETERMINACIÓN DE TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS. 182.

13.3.- VALORACIÓN DEL ANÁLISIS MORFOMÉTRICO. 184.

14.- VALORACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y ULTRAESTRUCTURALES EN CADA TIPO DE FIBRAS. 184.

14.1.- VARIACIONES EN LA SUPERFICIE DE CORTE TRANSVERSAL. 185.

14.2.- VARIACIONES EN LA DOTACIÓN MITOCONDRIAL. 186.

14.3.- VARIACIONES EN EL RETÍCULO SARCOPLÁSMICO Y TÚBULOS T. 189.

14.4.- VARIACIONES EN EL SUSTRATO ENERGÉTICO. 191.

15.- VARIACIONES MORFOLÓGICAS INDUCIDAS POR EL EJERCICIO EN CADA GRUPO DE NUESTRO PROTOCOLO. 192.

15.1.- VARIACIONES EN EL CRECIMIENTO LONGITUDINAL. 192.

15.2.- VARIACIONES EN EL CRECIMIENTO TRANSVERSAL. 202.

15.3.- VARIACIONES EN EL TEJIDO CONJUNTIVO. 209.

16.- ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS CUANTITATIVOS. 212.

16.1.- VARIACIONES EN LA PROPORCIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS DE FIBRAS. 212.

16.1.1.- Población control. 212.

16.1.2.- Deportistas de resistencia. 213.

16.1.3.- Deportistas de velocidad. 215.

16.2.-VARIACIONES EN LA SUPERFICIE DE CORTE TRANSVERSAL. 217.

16.2.1.- Variaciones en el grupo control. 218.

16.2.2.- Variaciones en el grupo de deportistas de resistencia. 220.

16.2.3.- Variaciones en el grupo de deportistas de velocidad. 221.

16.3.- VARIACIONES CUANTITATIVAS EN LA DOTACIÓN MITOCONDRIAL. 221.

16.3.1.- Variaciones en la población control. 223.

16.3.2.- Variaciones en los deportistas de resistencia. 224.

16.3.3.- Variaciones en los deportistas de velocidad. 226.

16.4.- VARIACIONES EN LA DENSIDAD DE CAPILARES. 228.

16.4.1.- Población control. 230.

16.4.2.- Deportistas de resistencia. 231.

16.4.3.- Deportista de velocidad. 232.

17.- ADAPTABILIDAD DE LA FIBRA MUSCULAR ESTRIADA ESQUELÉTICA: CAMBIOS EN EL FENOTIPO. 234.

CONCLUSIONES.

18.- CONCLUSIONES. 240.

BIBLIOGRAFÍA.

19.- BIBLIOGRAFÍA. 246.

TABLA DE ABREVIATURAS

α -GPDH.- α -Glicerofosfato deshidrogenasa.	Pm.- Peso molecular.
AcCo.- Acetil colina.	PoAb.- Anticuerpo policlonal.
Actina G.- Actina globular.	RNA _m .- Ácido ribonucleico mensajero.
ADP.- Adenosín difosfato.	RNA _r .- Ácido ribonucleico ribosómico.
AMP.- Adenosín monofosfato.	RS.- Retículo sarcoplásmico.
ATP.- Adenosín trifosfato.	SDH.- Succino deshidrogenasa.
CK.- Creatinina quinasa.	SO.- Oxidativa lenta.
CP.- Creatinina fosfatasa.	ST.- Tipo lento.
DNA.- Ácido dexosirribonucleico.	TG.- Triglicéridos.
DPN.- Difosfopiridín nucleótido.	TGF.- Factor de crecimiento y transformación.
EDL.- Extensor digitorum longus.	TM.- Tropomiosina.
FG.- Glicolítica rápida.	TnC.- Troponina C.
FOG.- Glicolítica oxidativa rápida.	TNF.- Factor de necrosis tumoral.
FT.- Tipo rápido.	TnI.- Troponina I.
HDL2-C.- Lipoproteína de alta densidad- colesterol.	TnT.- Troponina T.
IL.- Interleucina.	TPN.- Trifosfopiridín nucleótido.
kDa.- Kilodalton.	Túbulos T.- Túbulos transversos.
LDH.- Láctico deshidrogenasa.	VCO ₂ .- Volumen de anhídrido carbónico.
MBP.- Proteínas asociadas a miosinas.	VLDL-TG.- Lipoproteínas de muy baja densidad- triglicéridos.
MHC.- Cadena pesada de miosina.	VO ₂ .- Volumen de oxígeno.
MHCf.- Cadena pesada de miosina rápida.	VO ₂ max.- Volumen máximo de oxígeno.
MHCs.- Cadena pesada de miosina lenta.	
MLC.- Cadena ligera de miosina.	
MoAb.- Anticuerpo monoclonal.	
NADH-TR.- Naftil-acetil- deshidrogenasa tetrazolium-reductasa.	
PFK.- Fosfofructoquinasa.	
PGE1.- Prostaglandina E1.	
Pi.- Fósforo inorgánico.	

I n t r o d u c c i ó n

1.- TEJIDO MUSCULAR: GENERALIDADES.

La función motora activa en los organismos multicelulares, es asumida por células altamente especializadas, llamadas células musculares, capaces de responder con su contracción a estímulos adecuados. Esta función se realiza fundamentalmente por la transformación de energía química en energía mecánica, en el seno de la célula muscular o miocito. Es una propiedad común a cualquier tipo de célula animal, pero llega a su máxima expresión en estas poblaciones celulares. Para ello, casi todo su citoplasma está surcado por numerosos filamentos dispuestos ordenadamente en haces longitudinales, que al contraerse por interacción de unos con otros, acercan los extremos distales de la célula. Las características morfológicas de los miocitos vienen impuestas por su especialización funcional, para el mejor aprovechamiento de la energía. Su forma alargada y la disposición en haces ya nos habla de una gran capacidad de acortamiento y relajación.

Las necesidades de las diversas partes del organismo, en lo que concierne a tipos de contracción, no son iguales y van a determinar la existencia de diferentes tipos de fibras musculares, unas estriadas esqueléticas, otras estriadas cardíacas y un tercer grupo de fibras musculares lisas, que se van a diferenciar por el origen embriológico, la localización anatómica, la estructura microscópica, la innervación y la función.

El tejido muscular estriado esquelético, que es el que nos va a ocupar en el este estudio, viene definido ya desde Bichat, como el que compone los músculos de la vida animal o de relación. Es rojo, estriado y de origen miotómico. Todas las células que lo componen son alargadas y cada una posee numerosos núcleos periféricos, así como una estriación transversal a lo largo de todo el citoplasma, visible con microscopía óptica. Están controladas por el sistema cerebro-espinal y poseen contracción voluntaria. De la misma manera, la distribución y constitución del tejido conjuntivo que acompaña a estas estructuras, es esencial para el aporte de oxígeno y sustancias nutritivas, que necesitan de forma abundante. Está asociado el esqueleto por medio de los tendones, como punto de anclaje que los miocitos precisan para que su contracción produzca un desplazamiento de alguna parte del cuerpo, que es esencialmente el fin de su función.

2.- MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO.

2.1.- ORGANIZACIÓN MACROSCÓPICA DEL MÚSCULO ESTRIADO.

Al estudiar un corte transversal de un músculo estriado, vemos cómo todo el paquete muscular, de aspecto carnoso y rojizo, está rodeado por una vaina resistente de tejido conjuntivo denso, al que denominamos epimisio. Desde dicha capa, entran o salen vasos sanguíneos al interior del músculo. A partir de él se originan tabiques del mismo tejido, ricos en fibras colágenas, que penetran en el espesor de la masa

muscular, hasta rodear grupos de miocitos formando fascículos. Tales tabiques constituyen el perimysio y también conducen vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas. Desde el perimysio parten tabiques aun más finos, solo visibles con microscopía óptica, del mismo tejido conjuntivo, formando una red que se extiende longitudinalmente entre cada célula muscular, constituyendo el endomysio. Esta última porción es muy rica en capilares y fibras nerviosas terminales, que proporcionan nutrición e inervación directamente a los miocitos. (Figura1). Sin este almacén conjuntivo complejo y de alta significación funcional, la masa muscular, tan deformable y plástica, carecería de forma fija. Desde el punto de vista morfológico, los músculos se han dividido en base a su forma general y a su arquitectura fascicular, pero nosotros no vamos a profundizar en este apartado esencialmente anatómico (Williams y Warwick, 1985).

2.2.- LA CÉLULA MUSCULAR ESTRIADA ESQUELÉTICA.

2.2.1.- Estudio con microscopía óptica.

Por disociación de un fragmento de músculo esquelético, es posible llegar a separar elementos largos, generalmente cilíndricos, que son las células musculares estriadas. Tienen gran tamaño, si las comparamos con las de otros tejidos. Sus dimensiones transversales varían de 10 a 100 μm o más y su longitud pueden oscilar entre 1 y 40 mm, aunque ocasionalmente se han descrito hasta de 10 cm. Estas fibras, en cualquier músculo dado, tienden a poseer un calibre bastante constante, pero varían de un músculo a otro y según la especie que se considere (Figura 2).

Cada célula está limitada en su periferia por una membrana plasmática, bordeada exteriormente por una lámina basal, de reacción PAS⁺. El conjunto constituye el sarcolema (Mauro y Adams, 1961). Esta lámina externa está en contacto con una fina capa de tejido conjuntivo interfibrilar (Figura 3).

La mayor parte del citoplasma está ocupado por las miofibrillas (en el hombre más de 100 millones/ cm^2), que son el componente característico de la célula (Bowman, 1840), su conjunto constituye el mioplasma. En secciones transversales preparadas con técnicas antiguas, estas miofibrillas aparecen agrupadas formando pequeñas áreas poligonales, denominados campos de Cohnheim, que en la actualidad se consideran como resultado de la retracción que sufre el tejido durante la fijación.

Al corte longitudinal se observa cómo las miofibrillas se disponen paralelas entre sí, siguiendo el eje mayor de la célula, y están atravesadas por estriaciones aparentemente continuas y rectas que se alternan a lo largo de la fibra (Szent-Györgyi, 1953). Estas estriaciones muestran distinta afinidad por los colorantes y diferentes propiedades ópticas. Unas se tiñen débilmente con colorantes básicos y son isótropas con luz

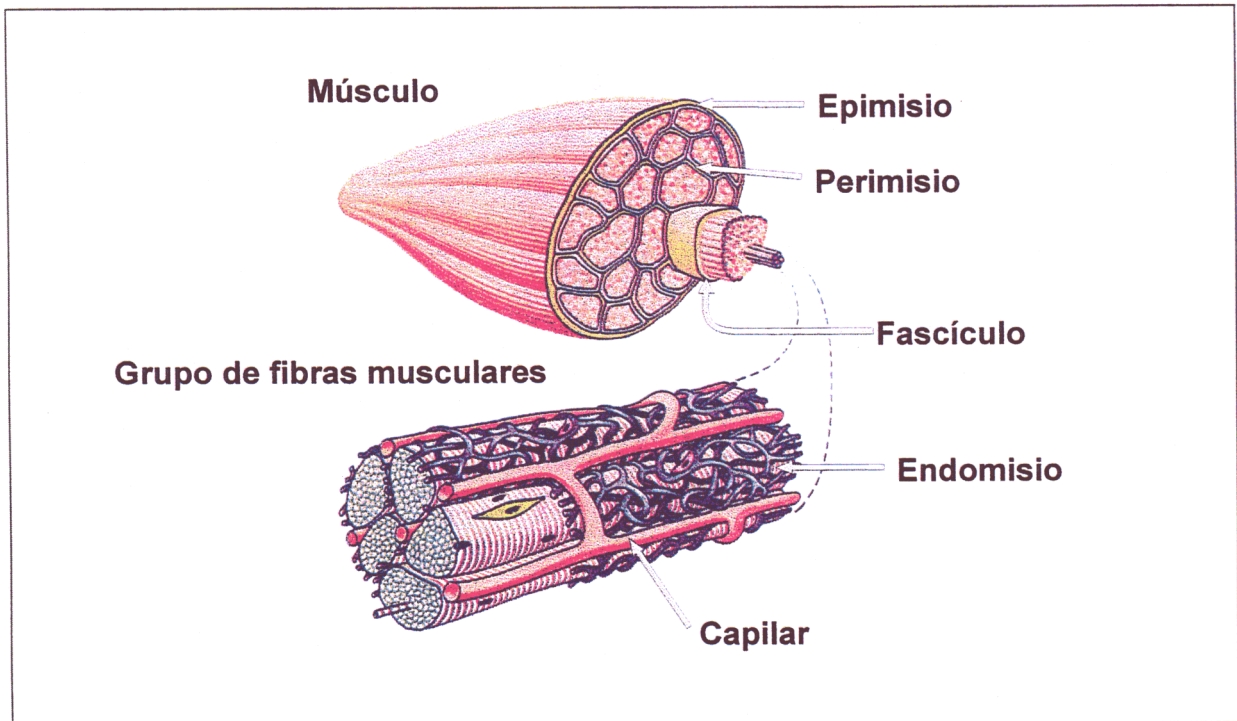


Figura 1.- Esquema de los distintos niveles de organización del músculo estriado esquelético: componentes estructurales y sus respectivas envolturas. Modificado de Williams y Warwick, 1985.

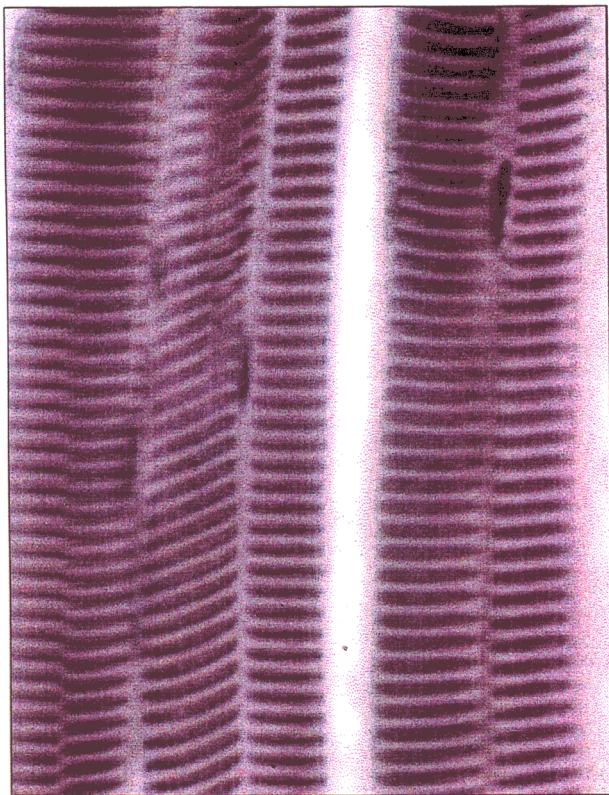


Figura 2.- Corte longitudinal de fibras musculares estriadas esqueléticas, en las cuales puede observarse la alternancia de bandas. Tinción de Jabonero. 500x.

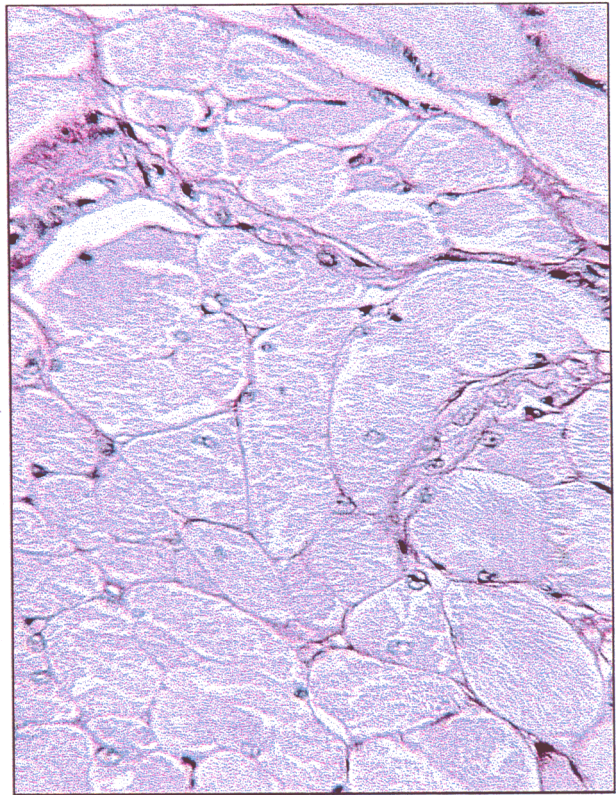


Figura 3.- Corte transversal de fibras musculares esqueléticas, bordeadas de la lámina basal con reacción PAS+. 500x.

polarizada, denominándolas bandas I. Otras reaccionan con intensidad a la hematoxilina y giran fuertemente el plano de luz polarizada, llamándolas bandas A o anisótropas. Las bandas I se dividen en dos por otra banda delgada, más oscura, llamada línea Z (membrana o estría de Krause). La banda A está también atravesada por una zona más pálida, la banda H (de Hensen) y en el interior de esta última, se puede apreciar una tenue línea más oscura, denominada línea M. El significado de estas diferentes bandas y su comportamiento durante la contracción, fueron descubiertos y estudiados independientemente por dos grupos de investigadores, A.F. Huxley y Neidergerke (1954) y H.E. Huxley y Hanson (1954) (Figura 4), nosotros profundizaremos en este estudio en el apartado correspondiente a ultraestructura.

El citoplasma restante o sarcoplasma, contiene los demás elementos celulares: Los núcleos, de forma alargada y orientados según el eje mayor de la células, se encuentran situados en la periferia, inmediatamente por debajo de la membrana plasmática, en número proporcional al volumen de cada miocito, pudiendo llegar a varios centenares por célula. Miden de 5 a 10 μm de longitud y de 1 a 3 μm de anchura y pueden presentar uno o dos nucleolos. Los sáculos del aparato de Golgi se sitúan en las proximidades de los polos nucleares, así como las mitocondrias, aunque también hay gran cantidad de ellas dispuestas en hileras entre las miofibrillas. En el sarcoplasma periférico existen ribosomas y, hay depósitos de glucógeno, gotas lipídicas y mioglobina homogéneamente distribuidos. El retículo endoplásmico o retículo sarcoplásmico (RS), está muy desarrollado y en relación directa con la arquitectura de las miofibrillas, como veremos más adelante.

2.2.2.- Ultraestructura de la célula muscular estriada esquelética.

2.2.2.1.- Núcleos.

Rechazados periféricamente por la estructura miofibrilar citoplásmica y situados debajo del sarcolema, los núcleos del miocito tiene la estructura típica de un núcleo metabólicamente activo: una cantidad moderadamente abundante de heterocromatina a lo largo de la cara interna de la carioteca (Moore y Ruska, 1957) en relación con la lámina nuclear (Franke, 1987) y abundante eucromatina que puede llegar hasta el 76% del volumen nuclear (Figura 5). El porcentaje de eucromatina varía en los diferentes músculos, dependiendo de la cantidad de trabajo que realizan habitualmente (Snow, 1983). Presentan uno o varios nucleolos, como reflejo de su constante actividad de síntesis proteica en relación con la actividad muscular (Scheer y cols., 1993). La envoltura nuclear esta formada por dos membranas y la más externa se relaciona con los elementos del retículo sarcoplásmico (Peachey 1965). Los poros nucleares descritos por Watson (1959), se hacen más patentes en fibras en regeneración (Price y cols., 1964). A pesar de su abigarrada estructura, representan el único camino directo entre

el núcleo y el citoplasma para el paso continuo de moléculas polares, iones, proteínas y RNAm (Pante y cols., 1993).

2.2.2.2.- Miofibrillas.

Este componente, que ocupa un 85-90 % del volumen citoplásmico, se extiende longitudinalmente de un extremo a otro de la célula. Los datos relativos a su ultraestructura, permiten confirmar los ya conocidos por el estudio con microscopía óptica y precisar las dimensiones de las diferentes bandas. Así vemos cómo las miofibrillas miden de 1 a 2 μm de diámetro. Longitudinalmente, la banda A tiene del orden de 1,5 a 1,6 μm en los vertebrados, permaneciendo constante en reposo y contracción. Se observa mejor la banda H y línea M central, determinando además una zona más clara a ambos lados de la línea M denominada banda L o pseudobanda H (Huxley y Niederggerke, 1954; Huxley y Hanson, 1954). La banda I, dividida en dos por la línea Z, mide 0,8 μm en reposo, pero disminuye durante la contracción (Page, 1969). La porción de miofibrillas comprendida entre dos estrías Z constituye una sarcómera, verdadera unidad contráctil, con una longitud de 2 a 3 μm en el hombre. A pesar de esta variación en la longitud total de la sarcómera durante la contracción, la longitud de los filamentos integrantes, permanece constante (Sosa y cols, 1994) (Figura 6).

A mediados de los años 50, el estudio del músculo con microscopía electrónica y el empleo de los métodos de difracción de rayos X, permitió, no solo interpretar los datos aportados por el microscopio óptico, sino también conocer nuevos e importantes argumentos sobre la estructura de las miofibrillas, como el hecho de que las bandas A e I contenían estructuras cilíndricas finas de orientación longitudinal, que recibieron el nombre de miofilamentos, identificando dos tipos de ellos, unos finos y otros gruesos, con una distribución característica de cada uno de ellos (Huxley, 1957; 1963; Page y Huxley, 1963).

En la misma época y basándose en los análisis bioquímicos que se desarrollaron en la primera mitad de este siglo, se llegó a conocer que en la composición de la célula muscular intervienen sobre todo dos proteínas: la actina y la miosina (Hasselbach, 1953; Perry y Corsi, 1958). La recombinación de ambas "in vitro" forma un complejo denominado actomiosina, que precipita en forma de fibrillas, con una disposición de estrías transversales, similar a la que se observó en el músculo.

Los filamentos gruesos de miosina, de un diámetro de 15 nm y con una longitud del orden de 1,5 μm , están dispuestos a todo lo largo de la banda A. Están erizados de expansiones bilaterales de alrededor de 13 nm de longitud, que actúan como puentes de unión. Dos expansiones del mismo nivel, situadas de manera simétrica a un lado y otro del filamento, representan un par. Cada par está diferenciado del siguiente por un intervalo de 14,3 nm y forma con los filamentos un ángulo de 12 nm. Esta disposición

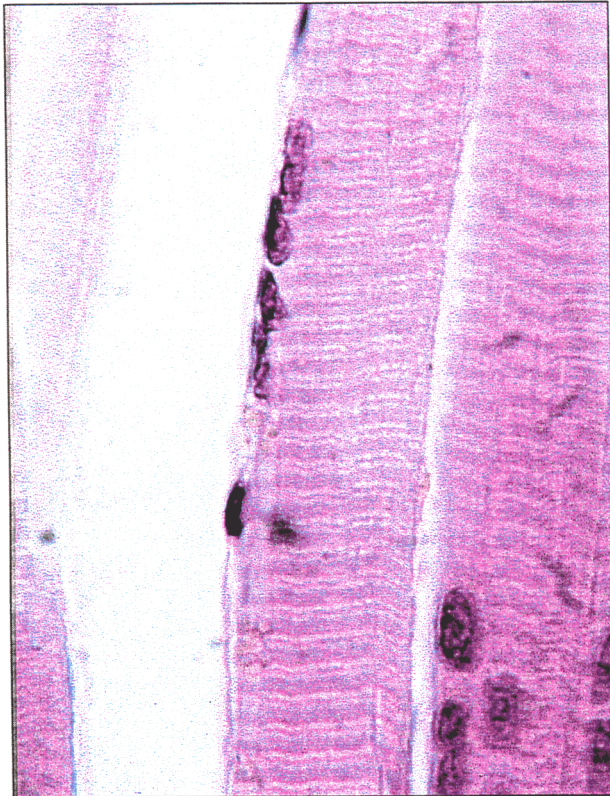


Figura 4.- Sección longitudinal de fibras musculares estriadas esqueléticas, apreciándose claramente las bandas A e I, así como la línea Z. H.E. 800x.



Figura 5.- Núcleo del miocito esquelético con su morfología típica y disposición característica de la cromatina. MET. 10000x.

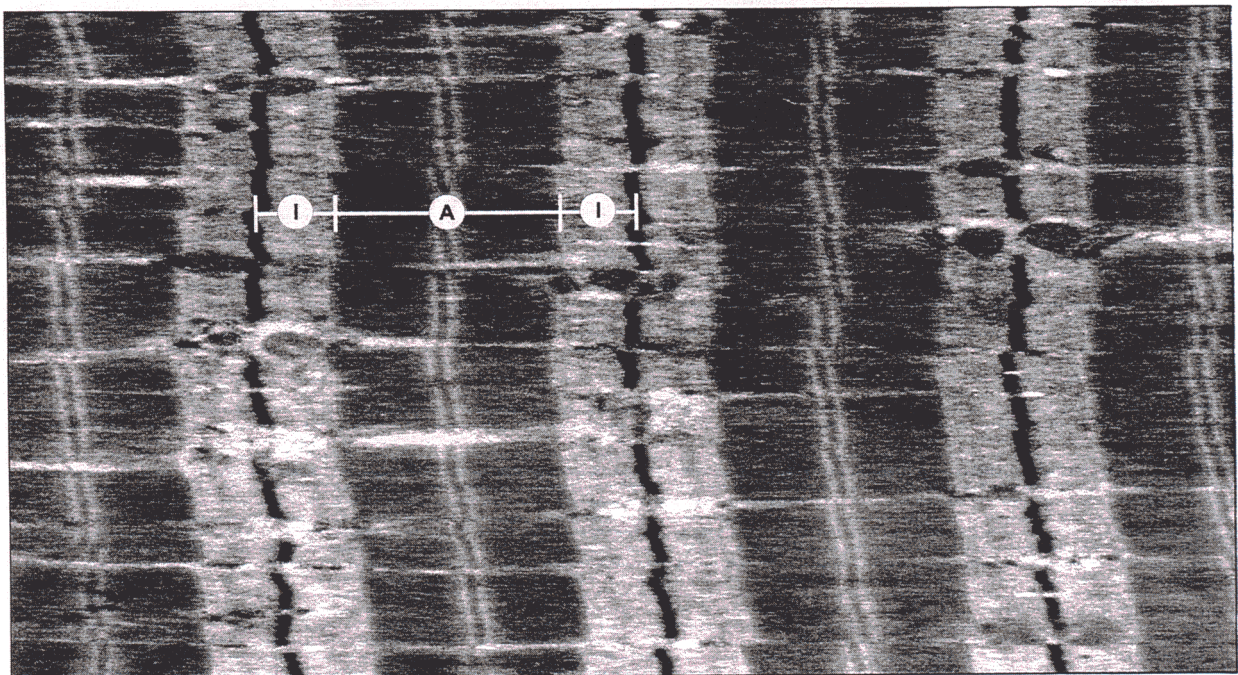


Figura 6.- Corte longitudinal de miofibrillas, con disposición en serie de sus sarcómeros. Estas estructuras están delimitadas por dos líneas Z, que delimitan dos semibandas I y una banda A entre ellas. En el centro de esta última pueden apreciarse las bandas H y la línea M. MET. 25000x.

espacial, describe así una hélice, cuyo paso es de 42,9 nm ($3 \times 14,3$ nm) (Huxley y Brown, 1967; Huxley, 1969) (Figura 7).

Los filamentos finos de actina, de 5 a 7 nm de diámetro y longitud de 1 μ m, se extienden a un lado y a otro de la estría Z en toda la longitud de la banda I. Penetran en la banda A entre los filamentos gruesos y se disponen paralelamente a ellos, pero sin llegar a la línea M, delimitando así, por los dos lados de ella, una región de baja densidad, desprovista de filamentos finos, la estría H. Cada filamento de actina está compuesto por dos cadenas enrolladas una sobre otra, constituida cada una por subunidades globulares de 5,46 nm, sufriendo de una cadena a otra un intervalo de decalaje de 2,73 nm, es decir, el valor de una subunidad. Las dos cadenas se cruzan regularmente cada 35,5 nm, determinando un paso de hélice de 71 nm (Hanson y Lowy, 1963; Huxley, 1963; 1965) (Figura 7).

Posteriormente se han caracterizado otros componentes proteicos filamentosos que forman parte de la sarcómera: Las filamentos de nebulina (Wang y Wright, 1988), que están asociados en toda su extensión con los filamentos finos, y ambos se insertan en el disco Z. Los filamentos de titina (Wang y cols., 1979), que también están estrechamente asociados a los filamentos gruesos, pero se prolongan por la banda I para insertarse en el disco Z.

La organización espacial de los filamentos finos y gruesos es particularmente evidente en los cortes transversales efectuados a diferentes niveles de la miofibrilla:

En la banda A, los dos tipos de filamentos coexisten. Los filamentos finos están repartidos entre los gruesos siguiendo un modelo hexagonal constante. Un filamento grueso está rodeado por una corona de 6 filamentos finos, cada uno situado a igual distancia de los tres filamentos gruesos vecinos. Los filamentos finos están separados entre sí por una distancia de 40 a 50 nm, en tanto que la distancia entre los filamentos gruesos y delgados es de solo 15 a 20 nm. De ellos se destacan las expansiones laterales descritas precedentemente. Estas últimas aseguran el contacto entre filamentos gruesos y finos en el curso de la contracción muscular. Dada la disposición helicoidal de las expansiones, cada filamento grueso se unirá a cada uno de los 6 filamentos finos que le rodean a lo largo de 42,9 nm (Skubishak, 1996). A nivel de la banda H, sólo son visibles los filamentos gruesos, distantes 45 nm y dispuestas según un esquema hexagonal. En la vecindad inmediata de la línea M, los filamentos gruesos, pierden sus expansiones laterales delimitando a un lado y otro de ella, en el seno de la estría H, la región más clara, que corresponde a la zona pseudo H. A nivel de la línea M, los filamentos gruesos están unidos entre ellos por un sistema de puentes muy visibles (los puentes M). La estructura de la línea M es más compleja de lo que se esperaba. Los puentes M que unen los filamentos gruesos están dispuestos en tres capas, cada una perpendicular al eje mayor de los filamentos. Otras veces, cada

filamento grueso, está rodeado por 6 filamentos finos (filamentos M), de 5 a 6 nm de diámetro que son paralelos entre sí y cruzan los puentes M en su mitad (Knappeis y Carlsen, 1968) (Figura 8).

En la banda I solo persisten los filamentos finos, manteniendo su patrón de disposición regular, que adopta una forma de red cuadrática regular en la vecindad de la estría Z. La estructura de la línea Z es más compleja (Knappeis y Carlsen, 1962), los filamentos finos de dos sarcómeras vecinas terminan y se interpenetran en todo el espesor de la estría del orden de 40 a 80 nm (Gauthier, 1970). En una sección transversal, cada filamento fino de una sarcómera se sitúa en el centro de un cuadrado, formado por los 4 filamentos finos de la sarcómera contigua. Un sistema de puentes, los puentes Z, unen estos filamentos entre sí. Esta configuración espacial está aun en discusión. Esquemáticamente existe la posibilidad de dos clases de puentes Z, unos oblicuos que comunican los filamentos finos de dos sarcómeras adyacentes y los otros transversales que unirán los filamentos finos de una misma sarcómera (Ullrick y cols., 1977; Yamaguchi y cols., 1985) (Figura 9).

2.2.2.2.1.- Composición bioquímica de las miofibrillas.

Las miofibrillas están constituidas por proteínas del citoesqueleto que representan el 70 % de las proteínas totales del músculo, estando clasificadas en el grupo de microfilamentos. Las proteínas fibrilares están formadas por dos componentes esenciales: la miosina II (54 %), componente de los filamentos gruesos y la actina-F (25 %), elemento principal de los filamentos finos. A ellas hay que añadir más de una docena de proteínas asociadas, que colaboran en el mantenimiento de la trama regular de los microfilamentos para organizar las miofibrillas.

La disolución de la miosina con soluciones salinas hipertónicas apropiadas, hace desaparecer los filamentos gruesos, atestiguando así la presencia de este componente en la banda A de la miofibrilla. En las mismas condiciones la extracción de la actina hace desaparecer los filamentos finos y demuestran la presencia de ellos en la banda I y los semidiscos oscuros de la banda A. El análisis ponderal de los constituyentes fibrilares y el marcaje con anticuerpos fluorescentes, han permitido confirmar estos hechos.

La molécula de **miosina II**, posee una longitud total de alrededor de 150 nm y un Pm de 480 kDa. Está formada por dos cadenas pesadas polipeptídicas idénticas y cuatro cadenas ligeras iguales dos a dos. Cada una de las cadenas pesadas tienen un aspecto parecido al de un "bastón de jockey" con una cabeza de 7 nm y un mango 2 nm de diámetro. En estas proteínas el fragmento amino-terminal ocupa la cabeza formando además el dominio motor, mientras que el extremo carboxilo-terminal de la cola permite un sobre enrollamiento en hélice α entre dos cadenas pesadas que da lugar a un dímero estable, formado por dos cabezas y una única cola, que permitirá la polimeriza-

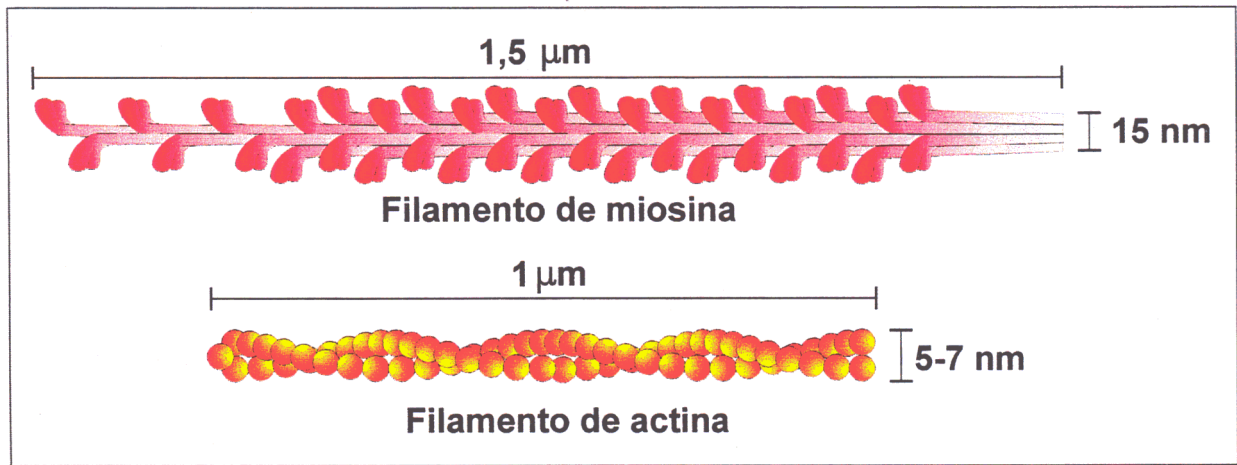


Figura 7.- Representación esquemática de los componentes moleculares que integran los microfilamentos.

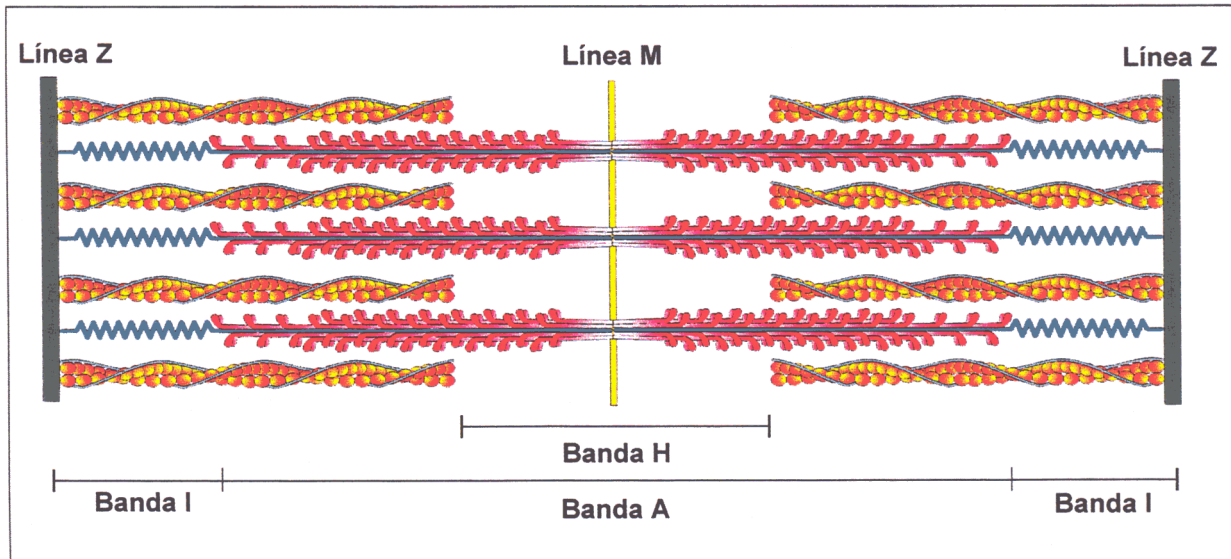


Figura 8.- Esquema de la distribución de los microfilamentos en una sarcómera.

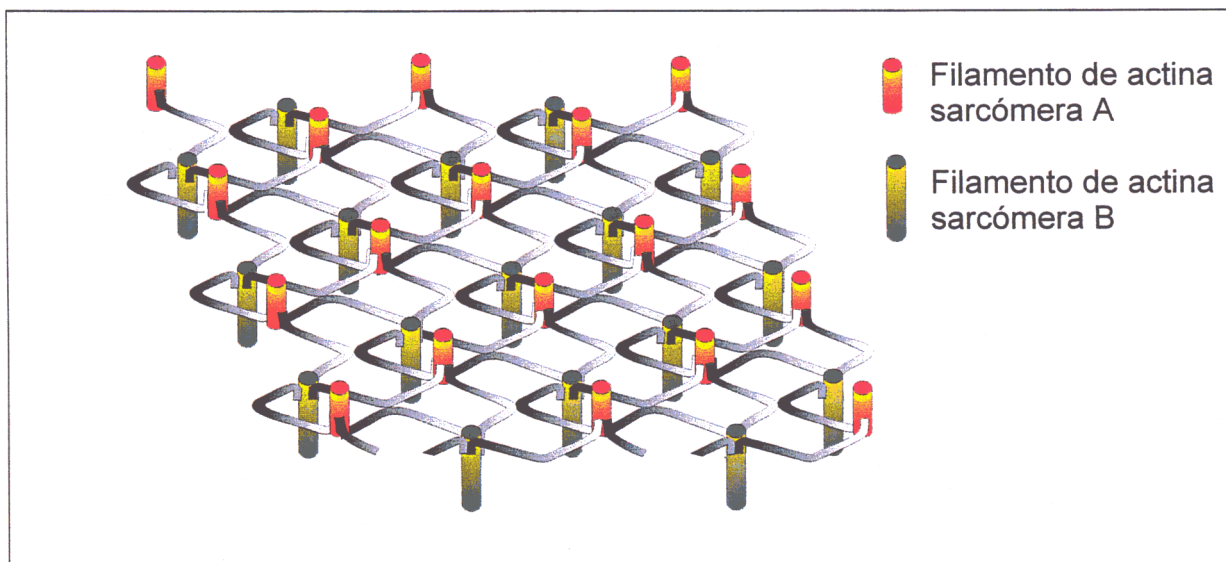


Figura 9.- Representación esquemática tridimensional de la malla cuadrática de proteínas que constituyen la línea Z. Modificado de Yamaguchi y cols. 1985.

ción entre moléculas iguales para formar los filamentos gruesos. Una cadena ligera de cada tipo va asociada a cada cabeza de las cadenas pesadas (Figura 10).

Las enzimas proteolíticas rompen la cadena en varias subunidades: La tripsina la escinde en dos partes, la H meromiosina o meromiosina pesada (MHC) y la L meromiosina o meromiosina ligera (MLC) (Szent-Györgyi, 1953). La MHC es fragmentada por la papaína en dos segmentos: S2 y S1. La MLC y el segmento S2 forman el mango y el segmento S1 la cabeza (Kominz y cols., 1965). Los segmentos S1 representan los lugares activos de unión con la actina y poseen la actividad ATPásica necesaria para la hidrólisis del ATP (Lowey y cols., 1969).

Alrededor de trescientas moléculas de miosina II se unen para constituir un filamento grueso. Su porción lineal se extiende paralelamente al eje mayor del filamento. Poseen un decalaje, cada una en relación con la siguiente y están orientadas de tal manera que el segmento S1 se encuentra siempre en posición distal en relación a la estría M. Los segmentos S1 que corresponden a las expansiones laterales de los filamentos gruesos adoptan una disposición helicoidal alrededor del eje del filamento (Lowey y cols., 1969; Schiaffino y Reggiani, 1996) (Figura 10).

La **actina** se presenta en los filamentos finos bajo la forma de una actina fibrosa (actina F) (Straub, 1942), constituida por dos cadenas longitudinales enrolladas en hélice α , con un diámetro de 8nm. Cada una de estas cadenas es el resultado de la yuxtaposición de los monómeros de moléculas de actina globular (actina G). Cada molécula de actina G (Pm 70 kDa), que en el músculo pertenecen a las actinas de clase α , tiene forma esférica, miden 5,6 nm de diámetro y se polimerizan con la misma orientación espacial, lo que le da al filamento una polaridad definida. Su extremo "más" se encuentra fijo al disco Z por una molécula de α -actinina (Lu y cols, 1992) y su extremo "menos" se extiende hacia el centro de la sarcómera. La doble hélice de actina F está asociada a otras proteínas fibrilares constitutivas del filamento fino (Blanchard y cols., 1989). (Figura 11).

Tanto el mantenimiento de su disposición ordenada, como las relaciones que establecen estos dos tipos de filamentos durante la contracción, dependen directamente de un grupo de proteínas asociadas a ellos, entre las que se encuentran las siguientes:

La **tropomiosina** (Pm 70 kDa) se presenta bajo la forma de filamentos de 40 nm de longitud, constituidos por un dímero de dos cadenas idénticas enrolladas en hélice α , estos filamentos se polimerizan entre sí para formar estructuras mas largas que se localizan en la garganta de la doble hélice de actina (Rowe, 1964), en toda su longitud, proporcionándole estabilidad y consistencia. Entre las funciones que se van conociendo de esta molécula está la cooperación con la α -actinina para unirse al extremo "mas" de los filamentos de actina en las proximidades de la línea Z y la atracción de las moléculas

de miosina II a las zonas donde se están formando las miofibrillas, y en las fibras maduras, el bloqueo de los lugares activos para la miosina a lo largo del filamento de actina. Cada molécula de tropomiosina tiene siete regiones de secuencias homólogas espaciadas regularmente. Se cree que cada una de estas secuencias se une a un monómero de actina (Phillips y cols, 1986) (Figura 11).

La **troponina**, formada por un complejo de tres proteínas (Pm 78 kDa), se encuentra repartida a intervalos regulares de alrededor de 40 nm a lo largo de la actina de manera que cada molécula de tropomiosina está asociada a un complejo de troponina. El complejo de troponina está constituido por tres subunidades, la troponina T (Pm 30 kDa), responsable de la localización espacial del complejo por su unión a la molécula de tropomiosina, la troponina I (Pm 30 kDa), que inhibe la interacción de la actina y miosina, y la troponina C (Pm 18 kDa), fijadora de Ca^{2+} en cuya presencia se favorece la interacción entre los dos tipos de miofilamentos. (Palmer y Kentish, 1994; Szczesma y Fajer, 1995), (Figura 11).

La **tropomodulina** (43kDa.) es una proteína de capucha para los extremos de los filamentos de actina, necesaria para mantener la longitud del filamento. En el músculo estriado, una molécula de tropomodulina está asociada al extremo libre de la actina, opuesto a la línea Z (Fowler y cols., 1993).

La **nebulina**, proteína muy grande que varía en tamaño según las especies. En el hombre tiene un Pm de 890 kDa. y una longitud de 1,3 μm . Está presente en el músculo esquelético pero no en el cardíaco. Aparece como un polipéptido sencillo, formado por una secuencia repetida de treinta y cinco aminoácidos que no muestran semejanza con otras proteínas conocidas (Wang y Wright, 1988). Dos filamentos de nebulina se extienden a lo largo de cada filamento de actina entre sus dos extremos, de forma que actúan como moduladores de su longitud. Presentan una estructura en hélice α que es probablemente estabilizada por la interacción con la actina: los módulos de 35 aminoácidos, miden lo mismo que las posiciones repetidas de los filamentos delgados, de forma que cada uno se relaciona con siete moléculas de actina, una de tropomiosina y un complejo de troponina. El extremo COOH-terminal, está unido al disco Z, interactuando con la α -actinina (Pfuhl y cols., 1994) (Figura 12).

En relación con los filamentos gruesos de miosina, encontramos también una serie de proteínas asociadas (MBP), entre ellas la proteína C, proteína H, proteína X, proteína M y miomesina. Se caracterizan por tener una forma similar a las moléculas de inmunoglobulinas o fibronectinas, con dos dominios que permiten relacionar entre sí dos estructuras diferentes. Estas proteínas se localizan en puntos concretos dentro de la banda A, colaborando en el mantenimiento de la posición de los filamentos de miosina entre sí, en relación con el filamento de titina y periféricamente con otras proteínas del citoesqueleto (Epstein y Fischman, 1991).

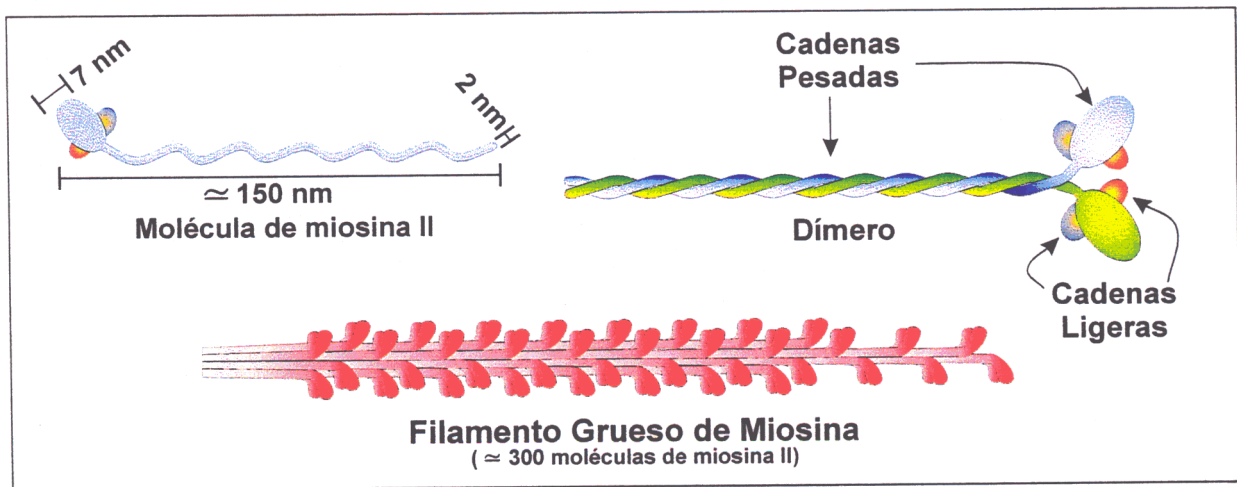


Figura 10.- Representación esquemática del microfilamento de miosina y sus componentes moleculares.

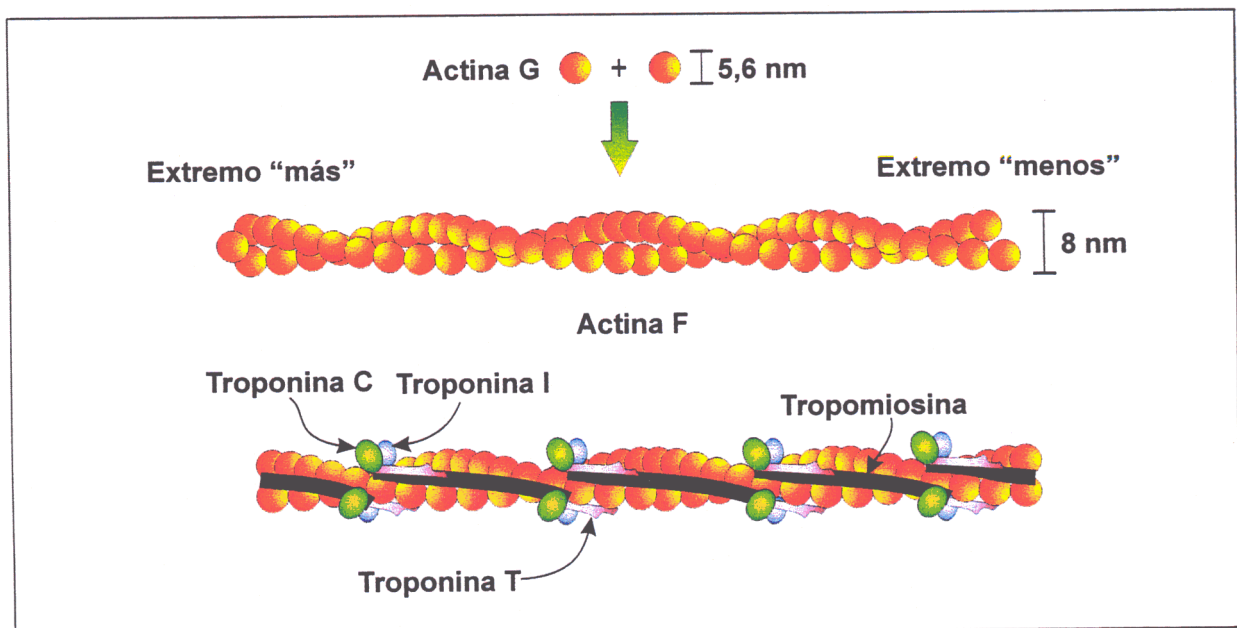


Figura 11.- Representación esquemática del microfilamento de actina y sus componentes moleculares.

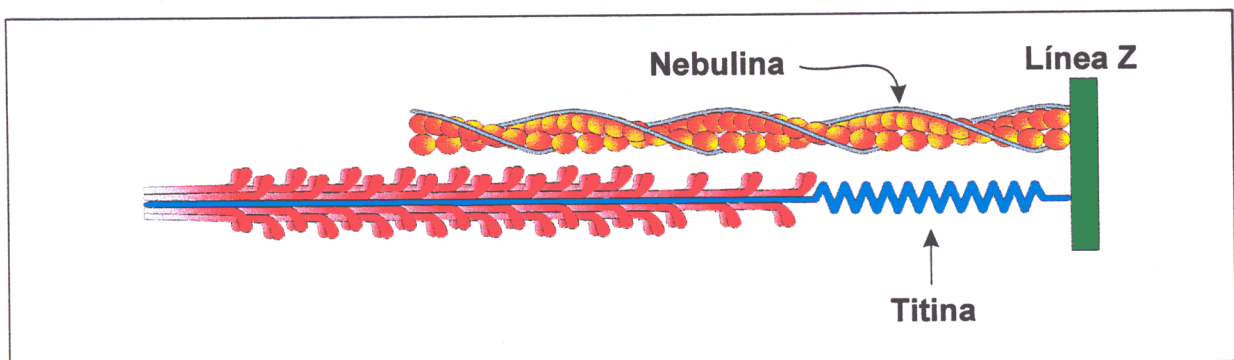


Figura 12.- Moléculas de nebulina y titina asociadas a los microfilamentos y su localización en la sarcómera.

Hay 11 bandas transversas en la zona A, localizándose dos o tres moléculas de **proteína C** (140 kDa) desde la 5 a la 11, a una distancia de 43 nm entre ellas y presentan lugares de unión para miosina y titina (Fürst y cols., 1992). La **proteína X** (145kDa), se localiza en las bandas 3 y 4 y parece corresponder a una isoforma de la proteína C. La **proteína H** (74 kDa), se localiza entre la banda 3 y la línea M y una proteína similar se ha localizado en la banda 9, en la mitad de la zona A, coexistiendo con la proteína C. La **proteína M** (165 kDa) y la **miomesina** (185 kDa), posiblemente son isoformas del mismo compuesto. Se localizan a nivel de la línea M y junto con la creatín quinasa (CK) muscular en esta misma localización, es responsable de la variabilidad estructural que aparece en la línea M. En el extremo libre de los filamentos gruesos, a nivel de la unión de las bandas A-I, existe moléculas de AMP-deaminasas que se unen a miosina y titina (Vaughan y cols., 1993).

La **titina** o **conectina**, es una molécula de gran tamaño (2.500 a 3.000 kDa), tiene una estructura fibrilar y se extiende a modo de cuerda desde el disco Z hasta los filamentos gruesos introduciéndose como eje longitudinal central de los mismos sin llegar a ocupar la línea M. La porción de la molécula que se encuentra en la banda I es elástica, mientras que la porción incluida en la banda A es rígida, manteniendo los filamentos de miosina centrados en la sarcómera (Bennett y cols., 1997). Se une a la miosina en su porción MHC, a través de moléculas de proteína C. El extremo COOH-terminal está unido a la proteína M y miomesina.

A nivel de la línea Z, como lugar de anclaje de una parte de los filamentos de la sarcómera, también se han aislado e identificado proteínas concretas. La α -**actinina** (100 kDa) es un homodímero de subunidades alargadas en orientación antiparalela y de estructura similar a la espectrina y distrofina (Blanchard y cols., 1989). La β -**actinina** o proteína Cap-Z (36 kDa) es una proteína de capucha para el filamento de actina a nivel de la línea Z (Schafer y cols., 1994). Además hay otras proteínas en estudio, como la amorfina, tensina, proteína Z, eu-actinina, Z-nina, etc, de las que todavía no se saben si son asociaciones enzimáticas para el trabajo o productos de degradación de las demás proteínas (Vigoreaux, 1994).

Existen además una serie de proteínas que asocian estas estructuras entre sí y con otros elementos celulares, entre ellas destacaremos la desmina y la vimentina, que unen paquetes de miofibrillas contiguos a nivel de la línea Z (Lazarides, 1980; Tokuyasu y cols., 1983) y la esquelemina y la distrofina que une las miofibrillas, a nivel de la línea M con proteínas relacionadas con la membrana plasmática (Price y Gomer, 1993).

Cada una de estas proteínas, presenta variaciones concretas en sus moléculas, que dan un carácter propio a cada tipo de fibra muscular, condicionando su relación con el resto de proteínas de la célula y con el microambiente, por supuesto su función. Cada una de estas moléculas o isoformas, están codificadas por familias de genes

estrechamente relacionados entre sí y que están siendo estudiados por numerosos grupos de investigadores. Nosotros profundizaremos en este punto al tratar la heterogeneidad de las fibras musculares extrafusales.

2.2.2.3.- Sarcolema.

El sarcolema fue el termino empleado por Bowman en 1840, para denominar la envoltura superficial de la fibra muscular, visible a microscopía óptica. Estudiada con microscopía electrónica se ha demostrado que este sarcolema es el resultado de la yuxtaposición de la membrana plasmática, el plasmalema, en la parte interna y una lámina basal que la recubre externamente. Las dos capas están íntimamente aplicadas una a la otra (Mauro y Adams, 1961; Bonilla, 1983) (Figura 13a).

La lámina basal es la parte mas externa de la fibra muscular y es segregada por la célula muscular misma. Mide 30-50 nm y está compuesta por dos capas de diferente densidad electrónica. la lámina lúcida y la lámina densa, externa a la anterior. La lámina densa está compuesta por glucoproteínas y una variedad de proteínas estructurales incluyendo colágeno tipo IV, mientras que la lámina lúcida esta integrada fundamentalmente por fibronectinas, entactinas y lamininas (Duance y cols., 1980; Stephens y cols., 1982; Hall y Enver, 1994). Esta última proteína está más concentrada en la porción de la lámina basal en contacto con la terminación axónica que inerva la fibra muscular (Moscoso y cols. 1995; Iglesias y cols. 1995). Externamente a esta lámina basal aparece una capa denominada reticular compuesta por colágeno, en particular del tipo I y III (Dunn y cols., 1984), proteoglicanos y fibronectina. Este retículo está segregado por el tejido conjuntivo adyacente a la fibra muscular y está poco desarrollado en el músculo normal.

El plasmalema es el recubrimiento eléctricamente excitable de la fibra y está compuesto por una bicapa lipídica y una variedad de proteínas metabólicamente activas que actúan como receptores. En ella aparecen invaginaciones que penetran hacia el interior de la célula y forman un sistema de túbulos transversos (túbulos T), rodeando las miofibrillas a nivel de la unión de las bandas A e I y en estrecha relación con el retículo sarcoplásmico.

La estructura macromolecular del plasmalema no es todavía completamente conocida, pero la distribución de las proteínas en la bicapa lipídica ha sido bien estudiada por técnicas de criofractura, revelando las proteínas integrales como partículas intramembranas o en las depresiones de ambas caras de la membrana. Variaciones en esta distribución han sido estudiadas en relación con el desarrollo, función fisiológica y estados patológicos (Shotton, 1982). Las mismas técnicas revelan pequeñas cavidades e invaginaciones, particularmente abundantes en el lado protoplásmico. Este fenómeno tiende a ser mas frecuente a nivel de las bandas I

(Bennett, 1960). Con microscopio electrónico de transmisión las cavidades aparecen como pequeñas y numerosas vesículas a lo largo de la superficie interna de la membrana plasmática. Son continuas con esta membrana y se abren al espacio extracelular. En estas invaginaciones se han caracterizado proteínas como la distrofina y la α -1 sintrofina, sobre todo en zonas próximas a la presencia de mitocondrias (Wakayama y cols., 1997). La distribución de proteínas que ponen en contacto la cara interna de la membrana plasmática con el citoplasma, han llevado a Muñoz y cols. (1995) a determinar la existencia de subcompartimentos en el sarcolema, todos ellos con formación de caveolas (Figura 13b), y así hablan de una fracción sarcolémica 1, caracterizada por presentar receptores para β -1-integrina, caveolina y clatrina, igual que la fracción de túbulos T, mientras que la fracción sarcolémica 2 presenta receptores para β -1-integrina y distrofina, menor número para caveolina y casi ninguno para clatrina.

Se han descrito otras proteínas del citoesqueleto asociadas al plasmalema, como la vinculina y unas proteínas espectrina-like asociadas o no a subunidades de α -fodrina en distintos dominios del sarcolema (Porter y cols., 1997). La vinculina (Pm 130 kDa), está presente como una estructura ortogonal, cuya banda transversa llamada costámero, se sitúa encima de la banda I (Figura 14). Los costámeros están divididos en dos partes por la línea Z, pero la vinculina no está presente sobre esta línea. Se ha sugerido también que los costámeros están físicamente enganchados con las miofibrillas (Pardo y cols., 1983). Mediante estudios inmunocitoquímicos, se ha demostrado que varios anticuerpos contra determinantes β -espectrina, están asociados con el plasmalema del músculo esquelético humano (Appleyard y cols., 1984) y a las líneas Z (Ehmer y cols., 1997). Mondello y cols (1996), han llegado a determinar 10 proteínas diferentes en los costámeros, utilizando técnicas inmunocitoquímicas e indican que los costámeros también están en relación con la línea M.

No obstante la morfología del sarcolema muestra variaciones de esta descripción dependiendo de la especialización de algunas regiones del músculo, como veremos al hablar de la unión miotendinosa, unión neuromuscular y relaciones con las células satélites.

2.2.2.4.- El sarcoplasma y sus componentes.

La mayor parte del citoplasma de la célula muscular está ocupado por las miofibrillas. El citoplasma restante o sarcoplasma contiene el resto de los elementos celulares:

El retículo endoplásmico liso o **retículo sarcoplásmico (RS)**, cuya existencia fue ya reconocida por los antiguos autores (Veratti, 1902), aparece al microscopio electrónico bajo la forma de una compleja red de canales distribuidos alrededor de las

miofibrillas (Bennett y Porter, 1953). Las formaciones membranosas, agranulares que lo componen son de tres tipos (Andersson-Cedergren, 1959): a.- Cisternas aplanadas o cisternas terminales de 40 a 100 nm de longitud; están dispuestas transversalmente en el hombre, existiendo dos, una a cada lado del tubo T que se encuentra en esa misma localización, a nivel de la unión entre bandas A e I, por lo tanto se cuenta dos pares por sarcómera. b.- Tubos longitudinales que recubren la banda A y conectan las cisterna terminales. Miden de 30 a 60 nm de diámetro. A la altura de la zona H, los tubos se anastomosan entre sí, formando una red irregular de sáculos aplanados, los sacos H de 25 a 30 nm de grosor. c.- Tubos longitudinales que conectan cisternas terminales a nivel de la banda I (Figura 15).

Esta configuración específica del RS, parece ser conductiva para los cambios bioquímicos del espacio interfibrilar que acompañan a la contracción. Una gran parte del calcio está concentrado en las cisternas terminales bajo la forma de cristales de oxalato, detectables al microscopio electrónico por su electrodensidad. La cantidad de calcio contenido en esta localización, varía atendiendo al tipo de fibra de que se trate, como veremos más adelante (Fryer y Neering, 1986).

Entre las dos cisternas transversales de un mismo par, se encuentra el túbulo T, procedente de la invaginación del sarcolema, de diámetro muy pequeño y que comunica directamente con el espacio extracelular, la forma del túbulo T parece que se mantiene gracias a la presencia de proteoglicanos en su matriz extracelular (Davis y Carlson, 1995; Dell'Orbo y cols., 1995). En un corte longitudinal, la asociación de los tres elementos forma una figura característica: la triada (Franzini-Armstrong, 1971). Estos túbulos son opacificados después de la inyección de ferritina, contrariamente a los del RS (Hill, 1964). Cada túbulo T está en continuidad con los elementos homólogos situados en un mismo plano transversal. El conjunto define el sistema T. Esta localización precisa y constante de las triadas sobre la zona A-I de las sarcómeras hace pensar en la existencia de un sistema de anclaje entre ambos elementos celulares (Takekura y cols., 1996). En la proximidad de la membrana plasmática la pared del túbulo transversal es lisa; por el contrario, en contacto con las cisternas transversales presenta pequeñas densidades (pies) regularmente repartidos. Esta modificación estructural tiene lugar a intervalos regulares, poniendo al túbulo T en estrecho contacto con cada una de las membranas de las cisternas contiguas del RS, que se manifiestan con alta resolución, como ligeramente indentadas (Rayns y cols, 1975). La apariencia de estas zonas de aposición, nos recuerdan las "gap-junctions" de las células epiteliales. Esta diferenciación está en relación directa con la localización de la enzima CaATPasa, cuyo papel en el transporte del calcio a través del RS fue aclarado por Martonosi y Beeler (1983). Presenta diferenciaciones entre los distintos tipos de fibras (Dulhunty y cols, 1983) y juega un importante papel en los mecanismos de excitación-contracción (Dulhunty y Valois, 1983). Guo y cols. (1994), han identificado en la cara externa de la membrana del RS a nivel de la cisterna terminal y en relación con el túbulo T, una

proteína integrante de esta membrana de 90 kDa. que muestra clara preferencia por las fibras tipo II del músculo esquelético.

El RS participa en la contracción muscular mediante la regulación de la concentración de iones de Ca^{2+} . Este fenómeno se realiza por la excitación directa de sus paredes a nivel de las cisterna transversales por los contactos focales del túbulo T en el momento de la despolarización de la membrana, de tal manera que la onda se transmite casi simultáneamente a toda la célula.

El sarcoplasma posee **mitocondrias** en abundancia situadas en la zona interfibrilar, donde pueden encontrarse como elementos aislados, dispuestos simétricamente en relación con las líneas Z, o bien alineadas en forma de columna sencilla que corre paralela a las miofibrillas adyacentes de varias sarcómeras. En la zona de la banda I, las mitocondrias pueden verse extendidas transversalmente sobre las miofibrillas, pudiendo adoptar una forma anular, rodeándolas parcialmente (Andersson-Cedergren, 1959). Existen también mitocondrias en abundancia, adyacentes a la membrana plasmática, en las zonas próximas al núcleo, paralelas al eje mayor de la célula, o agrupadas en la región de la placa motora. El número y tamaño de las mitocondrias y la complejidad de sus crestas, varía dependiendo del tipo de fibras como veremos posteriormente. Contienen los enzimas necesarios para el metabolismo activo de las células musculares y se relacionan con la concentración intracelular de calcio.

El **aparato de Golgi**, poco extenso se localiza en la vecindad de los polos nucleares. Existe un tráfico entre esta estructura y el retículo endoplásmico, mediado por microtúbulos (Rahkila y cols., 1997). En la proximidad de los sáculos golgianos se hace patente la presencia de pequeñas vesículas que recuerdan a los lisosomas y gránulos de lipopigmento (Price y cols., 1964).

En el sarcoplasma periférico existen **ribosomas** libres y polirribosomas, sobre todo en las porciones distales de la célula y en la zona de unión neuromuscular, pero son poco numerosos en los polos nucleares. En raras ocasiones se asocian a membranas, pero en condiciones de regeneración, pueden verse íntimamente asociados a filamentos muy finos, supuestamente sintetizados aquí como precursores de los miofilamentos que darán lugar a miofibrillas (Przybylsky y Blumberg, 1966).

El **sarcoplasma fundamental**, repartido entre las diferentes organelas, encierra numerosas sustancias disueltas y elementos figurados. Contiene una fracción compuesta por agua y minerales (Ca, K, Mg, Na, Fe), glúcidos, lípidos y una fracción orgánica donde las proteínas solubles llamadas sarcoplásmicas, tienen un papel preponderante. Los glúcidos existen bajo la forma de glucosa y de glucógeno. Este último se encuentran como partículas β de 25-40 nm de diámetro, diseminadas entre las miofibrillas y en la proximidad de las mitocondrias. Diversas variedades de lípidos están

presentes, como fosfolípidos, glicolípidos y colesterol. Estos se pueden ver en las inmediaciones de las mitocondrias, como pequeñas gotitas lipídicas, de densidad homogénea (Lehninger, 1967).

El músculo estriado es un importante reservorio de aminoácidos (Bennett, 1960) que asumen un papel de suplencia en el caso de ausencia alimentaria. Entre las proteínas solubles, la mioglobina como pigmento respiratorio merece una mención especial. Esta cromoproteína está relacionada desde el punto de vista bioquímico con la hemoglobina (Huxley, 1963). Fija el oxígeno que alimentará secundariamente al sistema de la fosforilación oxidativa (Margossian y Lowy, 1973; Papadopoulos y cols., 1995). Su abundancia en cada célula varía proporcionalmente al condrioma y dependiendo del tipo de fibra (Jansson y Sylven, 1983). Tiene color rojo oscuro, y de su concentración depende la coloración de cada tipo de fibra muscular (Drews y Engel, 1961). Es preciso igualmente recordar la presencia de ATP y fosfágeno, fuentes de energía importantes del músculo estriado.

El citoesqueleto contiene filamentos inmunológicamente distintos al resto de proteínas fibrilares de la célula. Morfológicamente tienen un diámetro de 10 nm, intermedios entre la actina y la miosina. Estos filamentos intermedios identificados en el músculo esquelético, incluyen desmina o esqueletina (Lazarides, 1980; Thornell y cols., 1983) y vimentina (Lazarides, 1980). La desmina (Pm 50 kDa) se ha localizado en la periferia de la línea Z, formando una malla, interconectando eslabones de las miofibrillas, entre ellas y con el sarcolema (Tokuyasu y cols., 1983). Por otra parte, filamentos intermedios parecen también conectar la línea Z con las triadas. Estudios inmunocitoquímicos no han confirmado este hecho, pero han demostrado la presencia de filamentos de desmina conectando la líneas Z con la membrana nuclear (Tokuyasu y cols., 1983). La desmina es prominente en las fibras desarrolladas y en ciertas situaciones de enfermedad (Edström y cols., 1980; Thornell y cols., 1983), pero no es morfológicamente importante en el músculo esquelético adulto normal. Los filamentos intermedios de vimentina (Pm 52 kDa) frecuentemente terminan en la membrana nuclear y también forman conexiones con la membrana plasmática. Estos datos nos sugieren que la vimentina está asociada con los núcleos y puede intervenir en un mecanismo de soporte, pero su papel en el músculo humano no está aclarado en la actualidad (Lazarides, 1980).

2.3.- CÉLULAS SATÉLITES.

Estas células fueron descritas por Mauro (1961) en el músculo tibial anterior de la rana, aunque con muy poca diferencia de tiempo Katz (1961), describe una célula semejante cerca del huso neuromuscular del mismo animal. Pasados diez años Moss y Leblond (1971) le atribuyen un papel destacado durante el crecimiento y posteriormente Snow (1977 a y b) y Lipton y Schultz (1979) evidencian su gran trascendencia en los

procesos reparadores musculares. Este tipo celular se ha puesto de manifiesto en todos los músculos esqueléticos de los vertebrados y en algunos invertebrados, pero no en el músculo cardíaco ni en el músculo liso (Midsukami, 1981).

La célula satélite se encuentra confinada entre la lámina basal y la membrana plasmática de la fibra muscular, asentada en una depresión de dicha fibra y separada de ésta por una zona electro-transparente de unos 15 a 20 nm de anchura, por lo que parece que su núcleo está alineado con los mionúcleos. El contenido de la zona de separación electro-transparente está constituido por proteínas de la lámina basal (Mauro, 1961; Muir y cols, 1965). La mayor parte de las observaciones (Muir y cols, 1965; Schmalbruch, 1978 y Cull-Candy y cols 1980) están en favor de la no existencia de conexiones entre la fibra muscular y la célula satélite (Figura 16 a y b).

En el músculo estriado adulto de los mamíferos esta célula es fusiforme, con unas dimensiones de 25x4x5 μm aproximadamente, presentando expansiones, de alrededor de 40 μm , a un lado y a otro del cuerpo celular. Se encuentran orientadas con su eje mayor paralelo al eje principal de las fibras musculares (Muir, 1970; Mazanet y cols, 1982). Existen grandes diferencias de tamaño relacionadas con la especie animal estudiada (Muir, 1970 y Campion, 1984). Según observaciones de Schmalbruch y Hellhammer (1977), más de la mitad de las células satélites están acompañadas en su proximidad de un capilar. Aunque la mayoría de los autores indican esta orientación paralela a las fibras, hay trabajos experimentales que nos hablan de una situación oblicua (Königsberg y cols, 1975) y hasta transversal (Chou y Nonaka, 1977).

En cuanto a su ultraestructura, difiere notablemente dependiendo del estado metabólico. En fase de reposo, el núcleo presenta una morfología oval, con unas dimensiones de 10-15x2-5x1-3 μm . Es heterocromático y con dos centriolos (Venable, 1966; Hess y Rosner, 1970; Ontell, 1974; Ishimoto y cols, 1983). Su relación núcleo-citoplasma es muy elevada ya que éste último es poco abundante, conteniendo un aparato de Golgi y retículo endoplásmico poco desarrollados, así como algunas pequeñas mitocondrias y escasos ribosomas, lisosomas y microfilamentos de 10 nm de diámetro (Campion, 1984) (Figura 17).

Esta misma célula en estado activado, como por ejemplo en el período perinatal, presenta grandes diferencias ultraestructurales (Schultz, 1976). La morfología es muy semejante al fibroblasto. El espacio electro-transparente que le separa de la fibra muscular aumenta hasta 60 nm. La cromatina nuclear está mas dispersa. En cuanto al citoplasma, nos muestra un retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi bien desarrollados y gran cantidad de ribosomas. Se han descrito microtúbulos que eran reemplazados progresivamente por microfilamentos de 10 nm de espesor (Przybylski, 1971 y Lipton, 1977). Esta misma configuración morfológica también ha sido descrita en los procesos traumáticos, patológicos e irritativos del músculo (Snow, 1977a; Mastaglia

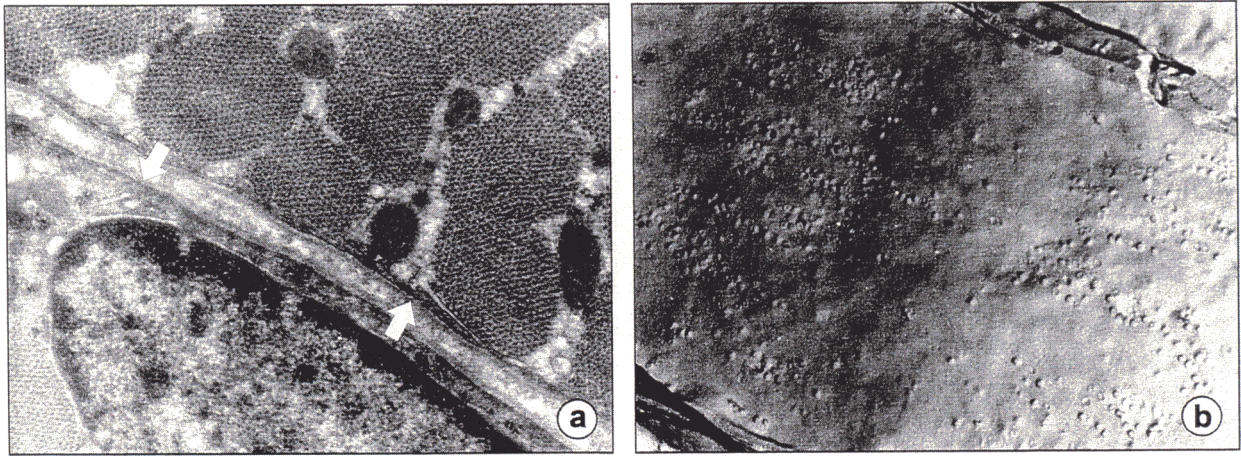


Figura 13 a y b.- En la imagen de la izquierda apreciamos el sarcolema, yuxtaposición de la membrana plasmática y la lámina basal (MET. 10000x). Derecha, caveolas situadas en la región de la banda I (MEB. 14500x), tomado de Zhang y Shafiq, 1985.

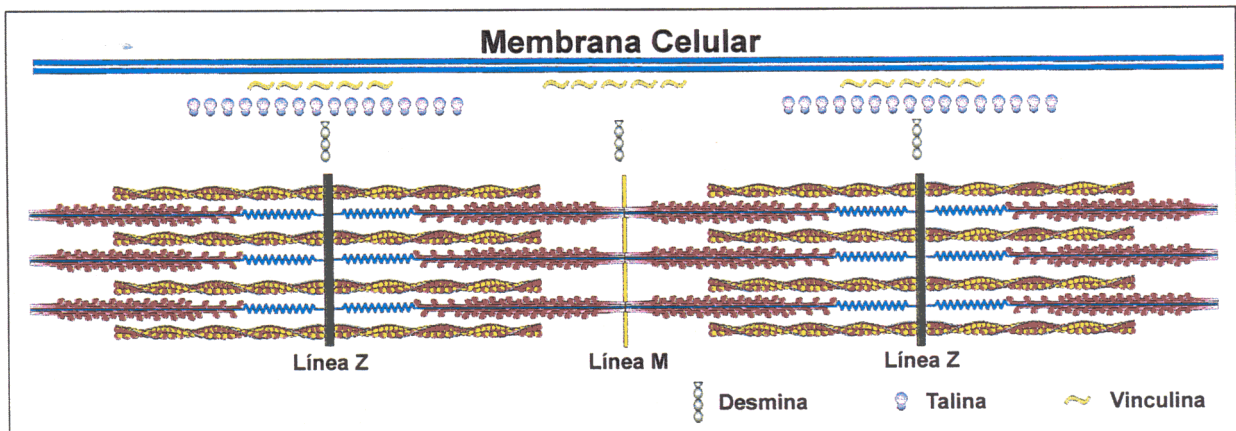


Figura 14.- Distribución esquemáticas de las proteínas constitutivas del costámero y su localización en la fibra muscular estriada esquelética.

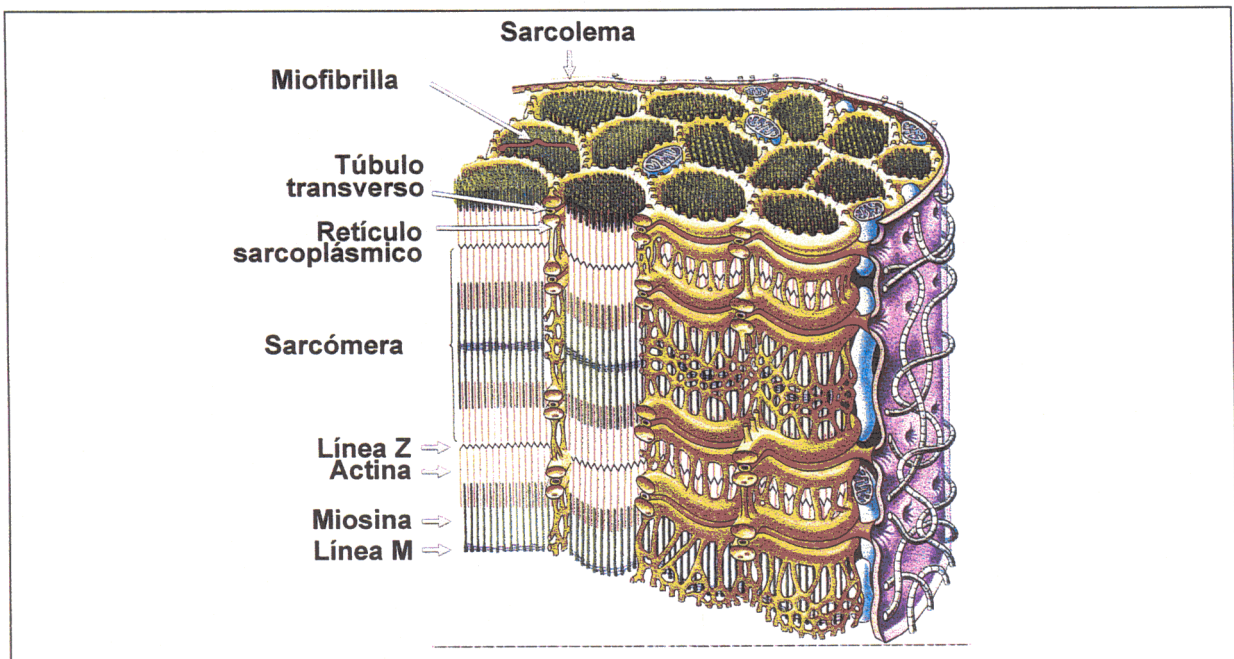
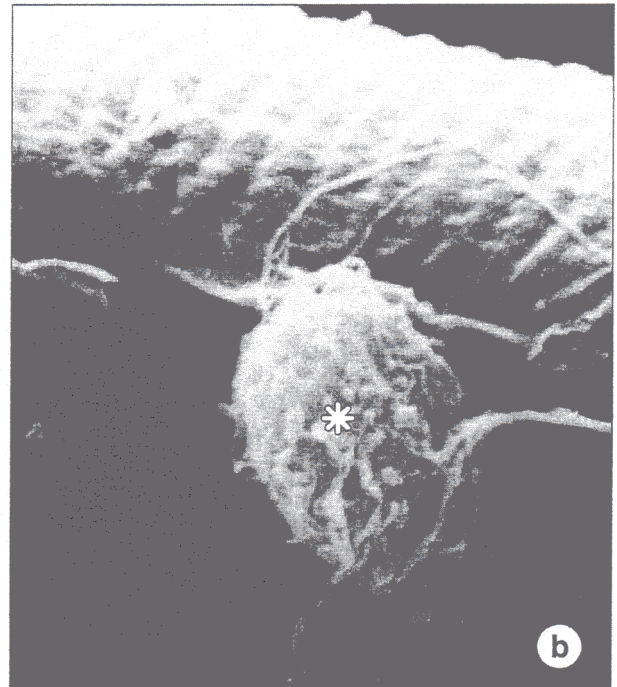
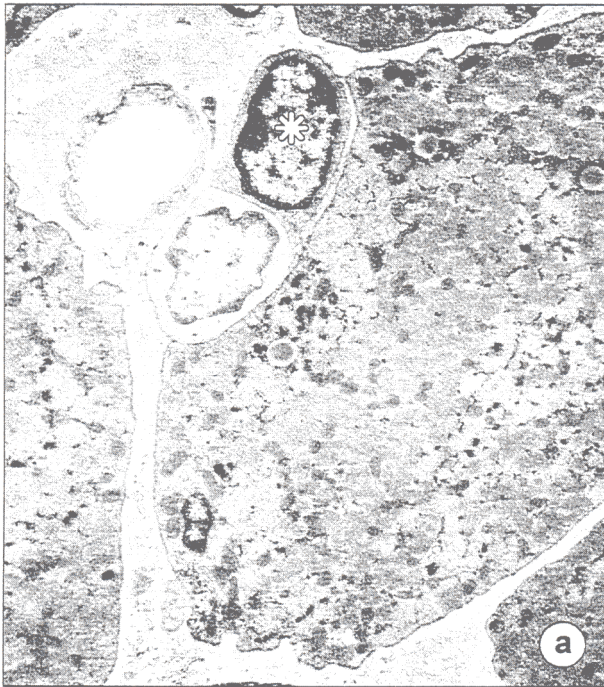


Figura 15.- Reconstrucción tridimensional de músculo esquelético mostrando la organización de miofibrillas, mitocondrias y sistema de membranas. Modificado de Williams y Warwick, 1985.



Figuras 16 a y b.- Corte transversal de una fibra muscular, en la parte superior podemos observar una célula satélite claramente separada de la anterior. MET. 3300x. Imagen derecha, microfotografía electrónica de barrido de una célula satélite, tomada de Bischoff, 1986, 5000x.

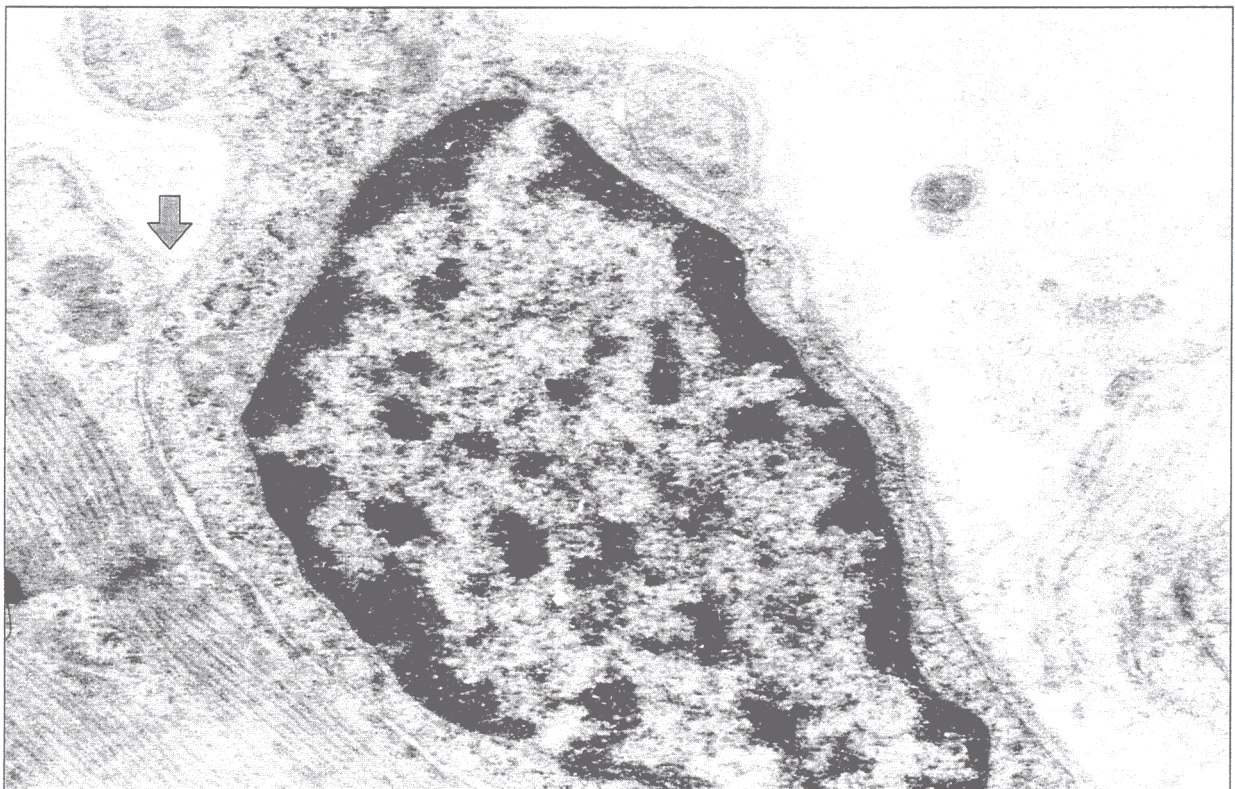


Figura 17.- Célula satélite. Apréciase su elevada relación núcleo/citoplasma. En este último, pueden verse algunas mitocondrias y ribosomas. Lámina basal común y membranas celulares independientes. (➡) MET. 20000x.

y cols, 1970 a y b; Wakayama y cols, 1979; Hess y Rosner, 1970; Murray y Robbins, 1982a y b). Estos autores han sugerido que la irritación de las fibras musculares, entrañaría la liberación de sustancias mitógenas que estimularían específicamente a las células satélites e intersticiales. Bischoff (1983) comprueba que extractos de músculo adulto, pueden estimular la proliferación de células satélites en cultivo, de la misma forma que lo hacen los extractos embrionarios, y Phelan y Gonyea (1997), comprueban como la irradiación puede frenar su proliferación o diferenciación.

En cuanto al número de estas células, parece que existe un criterio uniforme de todos los autores, considerando que viene a ser de aproximadamente 80 por mm (Ennesco y Puddy, 1964; Widdowson, 1970; Moss y Leblond, 1971; Layman y cols, 1980). La frecuencia de estas células es mayor en los músculos lentos que en los rápidos (Aloisi y cols, 1973; Schmalbruch y Hellhammer, 1977; Kelly, 1978). Milward (1980) basa esta diferencia en una concentración mas elevada en RNA y en un recambio más rápido de las proteínas. Schultz en 1974 propone una formula para calcular su número, pero posteriormente Gibson y Schultz (1982) y estos mismos autores (1983), desarrollan otro método de cálculo, basado en el cambio de densidad de los mionúcleos. Las células satélites están presentes durante toda la vida del individuo (Gutmann y Hanzlikova, 1972; Schmalbruch y Hellhammer, 1976), disminuyendo su número con la edad hasta que el músculo alcanza su talla adulta (Moss y Leblond, 1971). Recientemente Decary y cols. (1997), han demostrado que la capacidad proliferativa y la longitud de los telómeros de estas células disminuye durante las dos primeras décadas, mientras que los mionúcleos permanecen estables ya que la longitud de los telómeros es constante durante toda la vida. Mozdziak (1994), utilizando métodos inmunocitoquímicos, determina que existen $5,0 \pm 1,4$ núcleos de células satélites por cada 1000 núcleos de células musculares.

Aunque por los trabajos de Armend y cols (1983), sabemos que su origen es somítico, no se ha podido establecer todavía su línea de evolución. Las tres hipótesis propuestas son: 1) Que sean mionúcleos diferenciados, que se han separado de la fibra por un proceso de segregación de la membrana. 2) Que sean una subclase especial en la línea miogénica y que tengan un precursor común con los mioblastos embrionarios. 3) Que sean mioblastos, presumiblemente embrionarios cuya diferenciación está suspendida bajo la influencia de ciertos factores del desarrollo. Esta última hipótesis es la que mas partidarios posee (Yaffe y Saxel, 1977; Cossu y cols, 1980; 1982; Jones, 1982).

El camino emprendido en la actualidad para profundizar en este punto, lleva los pasos de los investigadores a estudiar la caracterización de sus proteínas, en reposo y en procesos de regeneración (Gorza, 1990). En distintos tipos de vertebrados, las fibras en regeneración expresan isoformas de miosina propias de momentos concretos del desarrollo, similares a las que expresan los mioblastos fetales (Düsterhoft y Pette,

1993), Tanto en los músculos rápidos como en los lentos, durante el proceso de regeneración, las células satélites solo expresan miosinas rápidas (Edom y cols. 1994), y solo expresan formas lentas, cuando tienen contacto con una fibra muscular (Esser y cols. 1993).

2.4.- VASCULARIZACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

Las ramas de la arteria principal más próxima entran, junto con el nervio, a lo largo de una zona de posición constante, el hilio neurovascular. Suelen existir arterias subsidiarias, que entran cerca de los extremos del músculo. En el perimysio se dividen en arterias de menor calibre y arteriolas, para terminar en capilares en el endomysio, que corren paralelos a las fibras musculares, presentando frecuentes anastomosis transversas que forman un enrejado tridimensional (Figura 1). Este lecho vascular es mucho más denso a nivel de las fibras rojas (Zweifeach y Metz, 1955).

El suministro y drenaje del lecho capilar ha sido objeto de controversias. Estudios fisiológicos utilizando como trazador sodio radiactivo (Barlow y cols, 1961) y exámenes microscópicos (Grant y Payling Wright, 1968), indican que hay dos circulaciones distintas en el músculo esquelético: Una vía nutricia, que proviene de la arteria principal y pasa a través del lecho capilar antes de ser recogida por las vénulas y venas para abandonar de nuevo el músculo por el hilio (Eriksson y Myrhage, 1972). La otra vía llamada no nutricia, es una vía alternativa, en la que parte de la sangre pasa a las arteriolas del epi y perimysio, lugares en los que existen pocos capilares, pero si abundantes anastomosis arteriovenosas, de modo que una gran parte de la sangre vuelve al torrente venoso sin pasar por los capilares (Tilton y cols, 1979; Mazanet y Franzini-Armstrong, 1982). Este camino se utiliza cuando se bloquea el flujo sanguíneo en el lecho capilar endomisial, durante la contracción muscular (Holley y Fahim, 1983).

La superficie de contacto entre los capilares y las fibras musculares, se ha propuesto como una medida del flujo de oxígeno entre músculo y sangre (Hepple, 1997). Según los trabajos de Ahmed y cols., (1997), el aporte capilar esta de acuerdo con el tamaño de la fibra muscular y es relativamente independiente del tipo de fibra.

El drenaje linfático comienza en los capilares linfáticos de las vainas de epimysio y perimysio y convergen en los linfáticos mayores, que acompañan a las venas, para abandonar el músculo.

2.5.- INERVACIÓN DEL MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO.

Cada músculo esquelético recibe uno o más nervios, dependiendo de su localización anatómica y de su disposición segmentaria. Después de dividirse en varias ramas pequeñas, el nervio penetra en el músculo por un lugar cercano a su inserción

menos móvil, y junto con los principales vasos sanguíneos entra en una pequeña región oval alargada, el hilio neurovascular, cuya situación es bastante constante en cada músculo (Coers y Woolf, 1959).

Cada nervio contiene tanto fibras motoras como sensitivas. Estas últimas comprenden las fibras mielínicas que regresan de los husos musculares, de las terminaciones sensitivas neurotendinosas y de las aponeurosis, así como aferentes dolorosas no mielinizadas de origen incierto. Las fibras motoras son también muy variadas, comprendiendo las eferentes mielínicas grandes de las motoneuronas del asta anterior de la médula (eferentes α) que inervan las fibras extrafusales, las pequeñas mielínicas (eferentes γ) que se dirigen a los husos musculares y las eferentes autonómicas finas, amielínicas, que inervan el músculo liso vascular.

El nervio se divide dentro del músculo en un plexo, que discurre por los tabiques epi y perimisial, antes de introducirse en el endomisio. En este lugar, se ramifican las eferentes α , repartiendo sus terminales entre un número variable de fibras musculares individuales. Estos terminales, que pierden aquí su vaina mielínica, se distribuyen en una banda transversa estrecha, cerca del centro del músculo, al tiempo que algunas de las aferentes inervan los husos musculares, a menudo en la misma región. Las fibras autonómicas se ramifican en el endomisio a través de todo el músculo, para inervar los vasos. Las terminaciones de los axones motores somáticos se apoyan sobre las fibras musculares individuales, en forma de una estructura especializada, la placa motora, que describiremos posteriormente.

Investigaciones fisiológicas han demostrado, que las fibras musculares inervadas por una neurona motora, están ampliamente esparcidas por el músculo de manera que, incluso cuando solo unas pocas unidades motoras son activas, la fuerza se genera de forma difusa (Burke y Tsairis, 1973). Se ha demostrado así mismo que cada axón termina en un territorio redondeado u oval con una considerable superposición entre las zonas adyacentes de inervación (Sissons, 1969).

2.5.1.- Unión neuromuscular.

Estas estructuras especializadas que constituyen la unión entre la terminación de los nervios motores y la superficie de la fibra muscular, fueron descritas por Doyere (1840), en los músculos de los invertebrados. Rouget (1862) demostró estas mismas formaciones en los vertebrados, con morfología común a todos ellos y considerándolas individualmente las denominó "placa terminal".

Métodos especiales de impregnación para microscopía óptica, demostraron que el nervio motor pierde su vaina de mielina antes de contactar con la célula muscular (Kühne, 1887; Wagner, 1847), y forma una arborización terminal (Boeke, 1910; Tiegs,

1932). Cada una de estas ramas ocupa unas depresiones en la superficie de la fibra muscular llamada hendidura sináptica primaria (Palade, 1954). Alrededor de esta estructura aparece una acumulación de núcleos de las células de Schwann, que acompañan a las terminaciones nerviosas, así como núcleos del músculo adyacente (Reger, 1954, 1955). Se sospecha la existencia de factores localizados en la matriz extracelular sináptica que serían responsables de esta acumulación nuclear (Brosamle y Kuffler, 1996) (Figura 18).

Estos datos fueron confirmados con microscopía electrónica por Beams y Evans (1953), así como la existencia de invaginaciones de la membrana sarcoplásmica en el fondo de la hendidura primaria, formando estrechos y profundos pliegues denominados hendiduras sinápticas secundarias (Palade, 1954). El axolema y el sarcolema están separados en todos sus puntos por una capa limitante que se continua con la lámina basal (Hall y Enver, 1994) que reviste el resto de la superficie de la fibra muscular (Robertson, 1956) (Figura 19).

Los datos muestran que la porción terminal de las ramas motoras, presentan algunas veces varicosidades o protuberancias terminales que encajan en las hendiduras sinápticas primarias (McMahan y cols, 1972; Korneliussen y Waerhaug, 1973). Observaciones con microscopía electrónica de barrido han revelado que las células de Schwann solo cubren por arriba las arborizaciones terminales, pero no la porción de protuberancias del axón que se internan en las hendiduras primarias. Los extremos de estas proyecciones digitales se unen a la superficie del sarcolema, sellando de esta manera las ramas terminales en las hendiduras (Ogata y Yamasaki, 1984, 1985) (Figura 20).

La anchura de las invaginaciones de las hendiduras sinápticas en su zona apical, es aproximadamente de 50 nm, pudiendo llegar en su profundidad a tener una anchura de 90 nm. De esta manera, el área de la fibra muscular en la unión neuromuscular puede incrementarse 4,5 veces (Andersson-Cedergren, 1959).

El axoplasma en la terminación nerviosa contiene mitocondrias y un elevadísimo número de pequeñas vesículas, idénticas a las vesículas sinápticas que se observan en las sinapsis axodendríticas del sistema nervioso (Robertson, 1956; Reger, 1957; 1958; Palay, 1958; De Robertis, 1958). Estas vesículas son pequeños almacenamientos del neurotransmisor acetilcolina (AcCo) (Castillo y Katz, 1955; 1956) que se liberan por exocitosis en la zona activa de la membrana presináptica, que aparece como especializaciones lineales de la membrana, dispuestas paralelamente a las hendiduras sinápticas secundarias. La membrana que recubre estas crestas y las fisuras del músculo subyacente, contienen una alta concentración de receptores de AcCo (Heuser y Salpeter, 1979), así como una elevada concentración de colinesterasa (Couteaux y Nachmansohn, 1938; Couteaux, 1955; Couteaux y Taxi, 1952) (Figura 20).



Figura 18.- Placas motoras con sus características terminaciones arborescentes. Técnica de Gross-Laurentiew.. 800x.

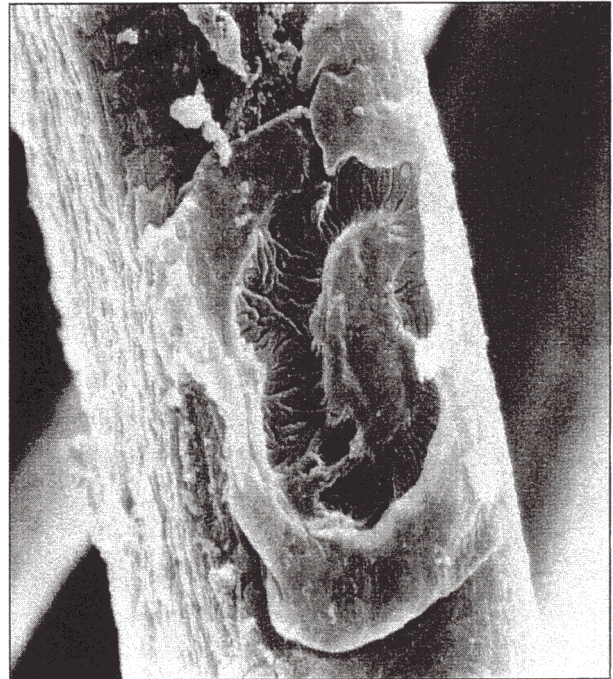


Figura 19.- Imagen de microscopía electrónica de barrido de las hendiduras primarias y secundarias en la superficie de una fibra muscular. 3000x. Tomada de Ogata, 1988.

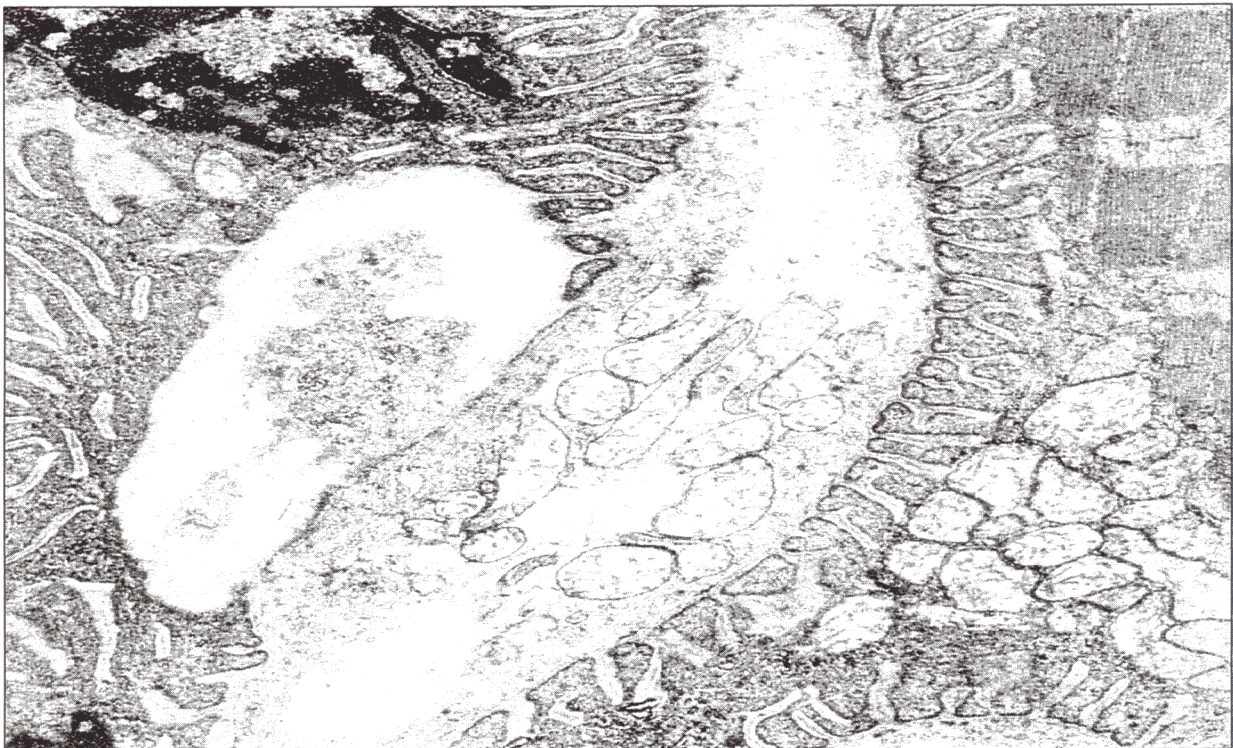


Figura 20.- Micrografía electrónica de una placa motora. Podemos observar la terminación nerviosa alojada en la hendidura primaria con sus correspondientes hendiduras secundarias. 13000x.

Existen características particulares de las placas motoras según el tipo de fibras musculares, como veremos al estudiar este apartado.

2.5.2.- Huso neuromuscular.

Los músculos estriados poseen una innervación aferente, por medio de la cual envían información sobre su grado de contracción al sistema nervioso central. Su grado de integración con impulsos aferentes originados en los tendones, ligamentos y cápsulas articulares, proporciona al individuo información sobre la posición y ritmo de movimiento de las diversas partes de su cuerpo, controlando así la posición de su organismo aun sin la información de los sentidos. Estos receptores aferentes existentes en el músculo se llaman husos neuromusculares (Kühne, 1864) y registran cambios longitudinales de las fibras que lo componen.

Los husos neuromusculares son pequeñas estructuras encapsuladas descritas por primera vez por Weismann (1861), que se encuentran insertadas en sentido longitudinal en los músculos, de tal forma que son estirados cuando estos se distienden. Están diseminados en toda la masa muscular y son más abundantes en aquellos que requieren un control más fino.

Son más anchos en la zona media y afilados en sus extremos, de 3 a 5 mm de longitud y 0,2 mm de diámetro medio. Cada huso está formado por fibras musculares estriadas modificadas, en número variable, de dos a veinte, con sus terminaciones nerviosas asociadas, tanto sensitivas como motoras, así como los vasos sanguíneos que las nutren. La formación completa está encerrada en una vaina que se continua en sus extremos con el tejido conjuntivo del endomisio o del tendón (Merrillees, 1962; Gruner, 1961).

Las fibras musculares que lo forman reciben el nombre de intrafusales y se conocen dos tipos diferentes. Ambas poseen una morfología característica, muy distinta a la de las fibras extrafusales. Unas se denominan fibras en cadena nuclear, que presentan los núcleos de la zona ecuatorial en disposición catenaria y las otras, fibras en saco nuclear por presentar numerosos núcleos acumulados en la zona ecuatorial (Figura 21).

Las fibras en cadena nuclear (Boyd, 1960), llamadas así por la presencia en su región ecuatorial de una o dos cadenas longitudinales, de núcleos groseramente rectangulares, en número de diez a veinte, que se disponen en el centro de la fibra. En las regiones polares siguen manteniéndose en disposición periférica. Su longitud es de unas 11 μm y terminan en extremos afilados, ligeramente por debajo de los polos del huso. Son las más numerosas apareciendo del orden de tres a nueve por huso. Además de los núcleos es interesante comentar otras características que las diferencian de los

demás tipos de fibras, como puede ser la disposición de las miofibrillas, que se encuentran empaquetadas en discretas unidades en el sarcoplasma. La línea M y la estría H aparecen nítidas y bien diferenciadas, pero la estría Z es delgada. Su RS está bien desarrollado a nivel de las bandas I y Z. La triada está generalmente localizada en la unión de la bandas I y A. El sarcoplasma interfibrilar es rico en glucógeno y contiene numerosas y grandes mitocondrias.

En las regiones ecuatoriales y yuxtaecuatoriales del huso, dos o tres fibras en cadena pueden compartir ocasionalmente la misma envoltura endomisial y en algunos puntos, dos células adyacentes pueden presentar regiones de cierre por aposición, compatibles con zónulas adherens (Corvaja y cols, 1967; 1969; Adal, 1969). En estas regiones la lámina basal es común y al corte transversal las dos fibras unidas presentan un contorno oval. Bajo la membrana sarcoplásmica abundan las vesículas de pinocitosis y en la zona central sarcoplásmica se han descrito gránulos limitados por membrana, íntimamente asociados al aparato de Golgi, que Ovalle (1972) apunta como gránulos de secreción.

El segundo tipo de fibra intrafusar, se denomina fibra en saco nuclear (Barker, 1948; Boyd, 1956). En ella aparece una dilatación ecuatorial desprovista de estriaciones, con acumulación de cuarenta a cincuenta núcleos esféricos, que llenan por completo y distienden la fibra. Es la llamada bolsa nuclear. A ambos lados hay una zona que Barker (1948) denominó región de miotubos. Aparecen en menor número encontrando una o dos por huso (Cooper y Daniel, 1956). Su diámetro es mayor que el de las fibras en cadena y también su longitud, con 22 μm , que hace que extiendan sus extremos por fuera de la estructura del huso. La porción extracapsular se continúa con el perimio de las fibras extrafusales o con las fibras de colágeno del tendón.

La disposición de las miofibrillas es diferente según la zona de la célula que consideremos. En las regiones polares aparece muy empaquetadas, formando un haz o manojo, con sarcoplasma muy reducido localizado ocasionalmente a nivel de las bandas I y Z. En la zona comprendida entre el saco ecuatorial y las zonas polares, región de los miotubos, las miofibrillas disminuyen, con estrías Z muy marcadas, pero con bandas H menos definidas y una línea M ausente o representada por dos delgadas líneas paralelas, separadas por un espacio sutil y claro. El RS aumenta en cisternas, pero presenta raras uniones con los túbulos T. En esta zona de los miotubos, aparece algún núcleo central, mitocondrias pequeñas en sus proximidades, multitud de ribosomas y ocasionalmente algunas cisternas de retículo endoplásmico rugoso. También localizamos aquí los gránulos limitados por membrana (0,06-0,30 μm), en relación con complejos de Golgi, compatibles con productos de secreción. En la zona ecuatorial se ha descrito en algunas especies de mamíferos un delgado anillo continuo y periférico de miofibrillas que rodean el empaquetamiento nuclear. En estas miofibrillas, los

miofilamentos, escasamente alineados, están distribuidos al azar, con bandas Z muy disminuidas y pérdida completa de línea M.

Se ha pretendido incluir en esta clasificación otra forma de fibras intermedias, pero en la actualidad se las considera como variaciones morfológicas de diferentes especies de mamíferos, con un patrón histoquímico común, igual al de las fibras con núcleos en cadena (Milburn, 1973). En el hombre se ha descrito una población celular diferente en las regiones polares del huso. Son células fusiformes, orientadas longitudinalmente, alojadas en un canal de la superficie de las fibras con núcleos en saco y menos veces en las fibras con núcleos en cadena. Están incluidas dentro de la lámina basal y a veces también aparecen en asociación con las fibras musculares extrafusales. Son probablemente de estirpe mioblástica (Kennedy, 1970).

En relación con la estructura del huso neuromuscular, debemos considerar dos tipos de innervación, que penetran en él, por el espacio periaxial (Adal, 1969). Una vía aferente, que lleva la información del estiramiento muscular a la médula. En este sentido, cada célula en saco nuclear recibe una rama terminal de una gran fibra mielínica sensitiva tipo IA, gruesa de 8-10 μm de diámetro, cuya terminación describe una espiral alrededor de la bolsa nuclear llamada terminación anuloespiral o terminación primaria.

Las células en cadena nuclear reciben la innervación aferente de dos fuentes. Unas ramas terminales que provienen de la misma fibra nerviosa mielínica anterior, aferente primaria, que ocupan rodeándolas las regiones centrales de estas células originando las terminaciones primarias, y en segundo lugar, las aferentes secundarias que son ramas de fibras independientes, de menor calibre (6-10 μm de diámetro), que acaban a cada lado de la terminación primaria, en forma de ramo, constituyendo las terminaciones secundarias (Barker y cols, 1970). La terminación primaria responde a la intensidad y rapidez del estiramiento muscular mientras que la secundaria reacciona solo al grado de estiramiento.

Hemos de considerar también la existencia de unas terminaciones eferentes sobre el huso neuromuscular, que tienen por objeto regular su umbral de excitabilidad, por medio de un mayor o menor grado de contracción de las fibras intrafusales (Emonet-Denand y cols, 1971; 1972). Estas fibras forman pequeñas placas motoras sobre las células del huso (Barker, 1948; Coers y Durand, 1956). Existen dos tipos de estas fibras motoras, que desde el Nobel Symposium de 1965 (Granit, 1966), se denominan β y γ . Las primeras son capaces de una contracción fásica y terminan exclusivamente sobre las fibras en saco nuclear. Las segundas son capaces de contracción tónica y acaban sobre los dos tipos de células. Ambos tipos de fibras nerviosas son delgadas con un diámetro de 3 a 7 μm (Schröder y cols, 1979 a y b) (Figura 21).

2.6.- TEJIDOS CONECTIVOS DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

Estas estructuras de soporte conjuntivo, que se distribuyen alrededor del músculo o bien aparecen en sus extremos como tejido intermedio de anclaje, están constituidas por dos variedades de tejido conjuntivo, laxo y denso respectivamente. La primera corresponde a las vainas que rodean al músculo, con una distribución de fibras y una composición de la sustancia fundamental, que colaboran en el mantenimiento de las características mecánicas del músculo durante el movimiento. La segunda variedad que se encuentra en la zona de unión miotendinosa, es muy resistente y posee una estructura capaz de soportar una tensión considerable.

2.6.1.-Vainas musculares.

La disposición general del tejido conectivo alrededor de las células musculares, ya se ha mencionado anteriormente, refiriéndose a ellas como las estructuras laminares o vainas, que constituyen el epi, peri y endomisio (Figura 1). Estas vainas desempeñan un importante papel en la organización de los paquetes musculares, proporcionando coherencia mecánica, a la vez que permiten un cierto grado de movimiento dentro de él. Otra de sus misiones es proporcionar el camino por el que los nervios y los vasos se distribuyen en el interior del tejido.

El endomisio tiene una especial importancia al formar parte del microambiente de las células musculares, permitiendo el intercambio de metabolitos entre ellas y los capilares vecinos. Su matriz rica en mucopolisacáridos es también fundamental, para mantener el flujo de iones durante la excitación de la membrana de la fibra muscular (Hill, 1970).

La proporción y tipo de moléculas de colágeno varía de unas zonas a otras, y así, el epimisio y el perimisio contienen colágeno tipo I como componente principal y tipo III en menor proporción. El perimisio también contiene pequeñas cantidades de colágeno tipo V (Duance y cols, 1980). El endomisio presenta los tipos I y III como componentes principales, escasa proporción del tipo V y una moderada cantidad de colágeno tipo IV, propio de las membranas basales, como demostraron Light y Champion (1984).

2.6.2.-Unión miotendinosa.

La forma en que las fibras musculares transmiten su fuerza contráctil a las estructuras vecinas, depende de la interacción entre estas fibras y el tejido conectivo que las rodea. En este sentido, son importantes las zonas de unión entre los extremos de las células musculares y las inserciones tendinosas, llamadas uniones miotendinosas. En esta unión, el tejido conectivo de las tres vainas se hace muy fibroso y denso y sus prolongaciones constituyen los haces de fibras del tendón (Schippel y Reissig,

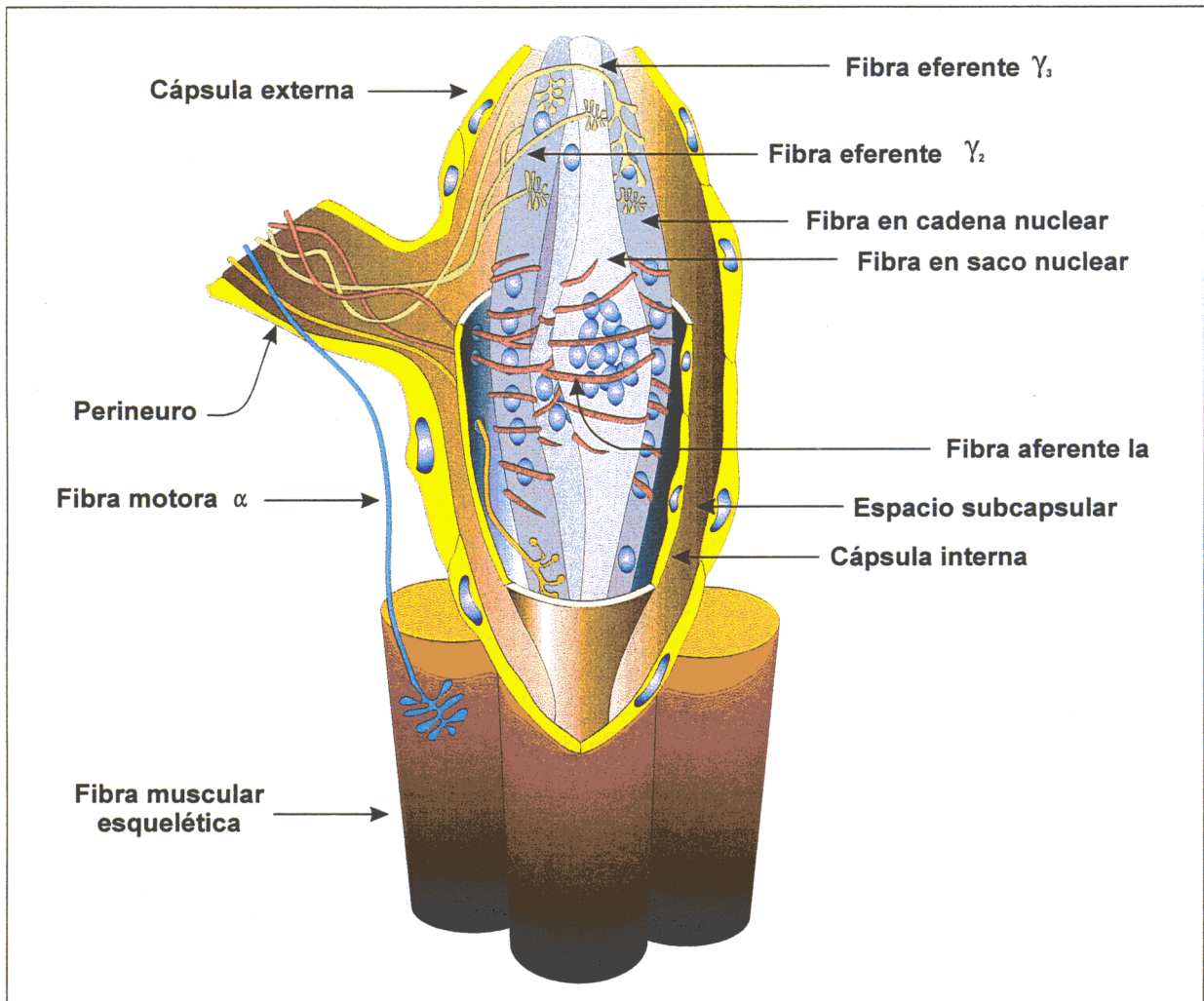


Figura 21.- Representación esquemática tridimensional de un huso neuromuscular. Modificado de Krstic, 1989.



Figura 22.- Unión miotendinosa, apreciándose la cohesión existente entre las vainas de reticulina que recubre el sarcolema y las fibras de colágeno del tejido conjuntivo vecino a la fibra muscular. Tinción de Van Gieson. 400x.

1968). Las fibras musculares en este punto pueden presentar formas variadas, romas, afiladas, o con una dilatación terminal (Muir, 1961; Stickland, 1983) (Figura 22).

El microscopio electrónico descubre que estos extremos de las fibras musculares, poseen un sarcolema con gran cantidad de indentaciones y una zona de hialoplasma en la que se insertan los filamentos de actina de las sarcómeras adyacentes (Hanak y Böck, 1971). Por fuera la lámina basal es gruesa y las fibras de colágeno y reticulina del conjuntivo están en íntimo contacto con ella. No existen indicios de desmosomas y parece probable que tanto aquí como a lo largo de toda la fibra muscular, las fuerzas contráctiles se transmitan de la superficie celular a la matriz del tejido conectivo circundante, principalmente por cohesión viscosa con sus fibras y su sustancia fundamental (Gelber y cols, 1960; Ishikawa, 1965).

2.7.- EMBRIOLOGÍA.

Las células que participan en la organogénesis del tejido muscular esquelético estriado, pueden dividirse en tres compartimentos: 1) Células de origen somatopleural, que van a formar el tejido conjuntivo muscular y que se separan del mesénquima subcutáneo en las regiones destinadas a musculatura; 2) células de origen somatopleural, que se diferencian en blastema tendinoso en las regiones extremas del futuro músculo; y, 3) células de origen somítico, que van a originar la línea miogénica (Chevallier y cols., 1977; Plaghki, 1985). Esta última línea celular se origina de una población de células madre, que emigra desde la cresta dorsal de los somitos. El mesodermo somítico segmentado no presenta ninguna especificidad regional y son los factores microambientales, tales como la matriz de colágeno extracelular y sus fibronectinas asociadas, los que determinan la dirección de migración de las células musculares originales (Chevallier, 1978; Ordahl y Le Douarin, 1992).

El ciclo celular de la línea miogénica, se ha llegado a conocer utilizando cultivos de células progenitoras. De esta forma sabemos que la población de células madre, puede dar origen a mitosis asimétricas, ante determinados estímulos, de manera que cada una produce una célula mioblástica embrionaria y otra célula madre, que mantiene el depósito. Los mioblastos diferenciados emigran a su localización definitiva y aumentan su diámetro (Ontell y cols., 1988). En este momento son células de mayor tamaño, con núcleo eucromático grande y llamativos nucleolos. En su citoplasma hay abundante retículo endoplásmico rugoso y numerosos polirribosomas, propio de las células con intensa síntesis proteica (Hilfer y cols., 1973). Estas células se van alineando unas con otras, para posteriormente fusionar sus membranas y formar una célula alargada, tubular y multinucleada. La alineación se ve favorecida por un tipo de fibronectinas segregadas por ellas mismas (Chiquet y cols, 1981). La fusión se acompaña de una entrada de calcio, por modificaciones del 1'AMP-c de la membrana, mediante la acción

de la prostaglandina E1 (PGE1) sobre la superficie del mioblasto (David y Higginbotham, 1981)(Figura 23 y 24).

Estos mioblastos embrionarios, han sido estudiados también en cultivos celulares marcados con vectores retrovirales (Wigmore y Dunglison, 1997), y se ha llegado a saber que en este periodo de su existencia es una célula activa, capaz de producir miosina embrionaria y que actúan como señales de localización para la llegada y alojamiento de una nueva población de mioblastos, llamados mioblastos fetales. En cultivos prolongados de células embrionarias mioblásticas, nunca llegan a convertirse en células fetales, lo que refuerza la idea de que ambas poblaciones tienen precursores diferentes (George-Weinstein y cols., 1993).

Con esta base de miotubos formados y las señales de localización que emiten, se produce la llegada de una nueva oleada de mioblastos, que se han dado en llamar mioblastos fetales, por producirse en un periodo del desarrollo más avanzado y porque en un principio se creyó que eran la línea evolutiva de la vida fetal. Estos mioblastos se colocan sobre la superficie de los mioblastos embrionarios y la imagen que ofrece este conjunto evolutivo, es la de una célula alargada central y multinucleada, el miotubo embrionario, rodeado de una nueva generación de células mononucleadas pequeñas, que utilizan la membrana de las anteriores como andamio para su fijación y con una lámina basal común (Cifuentes-Díaz y cols., 1995). Posteriormente las células recién llegadas se fusionan entre sí, formando una estructura longitudinal paralela a la anterior, que conocemos como miotubos secundarios fetales. Son capaces de sintetizar un tipo de miosina diferente, de contracción lenta (MHCs). La fusión de estas células coincide en el tiempo, con la llegada a zonas vecinas, de placas motoras en formación (Duxson y cols., 1989)(Figuras 23 y 24).

Después de un periodo de tiempo, estas fibras nuevas formadas se separan de la superficie del miotubo primario y una nueva oleada de células con el mismo precursor que las fetales, se fijan sobre las primarias. Son células secundarias adultas, llamadas así por aparecer en último lugar, con síntesis de miosina de contracción rápida (MHCf) y con receptores de AcCo en su membrana, como características funcionales de diferenciación con las fetales (Yablonka-Reuveni, 1995). Alrededor de esta formación aparece también el halo de las secundarias fetales que se han separado, y que tienen posibilidad de corregir su orientación en el paquete muscular, mientras que la posición de los miotubos adultos, dependen definitivamente de la orientación de la célula embrionaria que actuar de guía (Wigmore y cols., 1995). Ambos tipos de fibras secundarias continúan su crecimiento y diferenciación y aumentan el número de núcleos por progresiva fusión celular, incluso en el periodo postnatal (Figuras 23 y 24).

Cada célula embrionaria primaria puede servir de fijación y guía a un número variable de células secundarias, desde 5 a 9 en los pequeños mamíferos (Ontell y cols.,

1988), hasta aproximadamente 20 en el hombre (Stickland y Handel, 1986). Cuando su actividad inductora cesa, disminuye su diámetro y se confunde con el resto de las fibras. Algunas células mononucleadas persisten adheridas a su superficie por debajo de su lámina basal y parecen estar en relación con la población de células satélites descritas por Mauro (1961).

En un principio se pensó que la expresión de distintos tipos de miosina en las células secundarias, que va a dar lugar a diferentes tipos de fibras musculares de contracción rápida o lenta, dependía de los primeros contactos axónicos, durante el desarrollo de la innervación (Marechal y cols., 1984), pero posteriormente se ha visto la presencia de dos poblaciones de miotubos, embrionarios y fetales, conteniendo dos tipos de miosina ya sea alcalo- o ácido-estable, en ausencia de innervación, lo que sugiere la posibilidad de que las células mioblásticas posean su identidad metabólica, antes de toda innervación (Fremont y cols., 1983; Schiaffino y Reggiani, 1996) (Figura 25).

Una vez innervados los primeros esbozos musculares tienen un tiempo de contracción siempre largo, por contener miosina lenta (Condon y cols., 1990), y es posteriormente cuando al aparecer los miotubos de segunda generación, se sintetiza una miosina de contracción rápida (Devoto y cols., 1996), exclusivamente alcalo-estable, que darán origen a las fibras musculares tipo II. En semanas sucesivas, parte de estas células, se transforman en fibras musculares tipo I por el cambio de sus motoneuronas de fásicas a tónicas, interpretándose este hecho como una adaptación por el uso del músculo (Rubinstein y Kelly, 1981).

Durante todo este proceso, fueron localizados RNAm para miosinas en regiones periféricas de las células primarias y secundarias, contribuyendo a que los polirribosomas de esta localización fabriquen las proteínas cerca de las membranas (Young y cols., 1975). Las miosinas II recién formadas, se asocian con otros filamentos del citoesqueleto de 4 a 10 nm de diámetro, que las orientan paralelas al eje longitudinal de las células (Pomeroy y cols., 1991), y por acción de la transglutaminasa estas moléculas de miosina se asocian entre ellas y forman filamentos (Kang y cols., 1995).

En la membrana aparecen moléculas de α v-integrina, más concentrada a nivel de la zona de nacimiento de las miofibrillas, contribuyendo a ordenar los filamentos de miosina y actuando como receptores de adhesión que más tarde formaran parte de los costámeros de las células maduras. Por lo tanto tienen un papel de anclaje lateral miofibrilar. Otra integrina, la α 3, también parece relacionada con estas primeras miofibrillas al comienzo de la miofibrinogénesis, pero se disocia de su localización al comenzar la estriación, lo que sugiere un posible papel estabilizador en las primeras etapas (McDonald y cols., 1995).

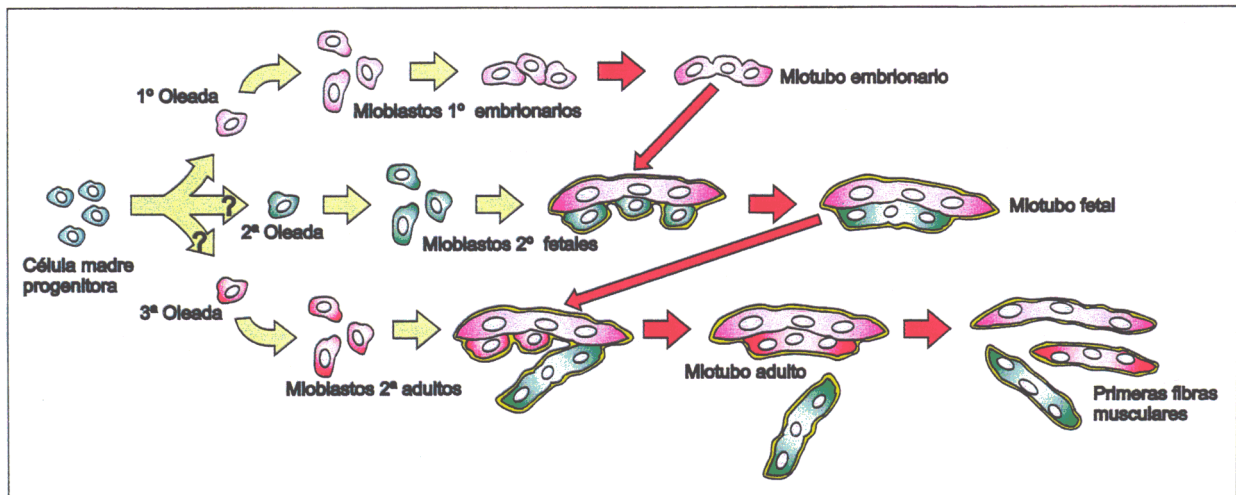


Figura 23.- Representación esquemática de la miogénesis y contribución de las diferentes poblaciones celulares.

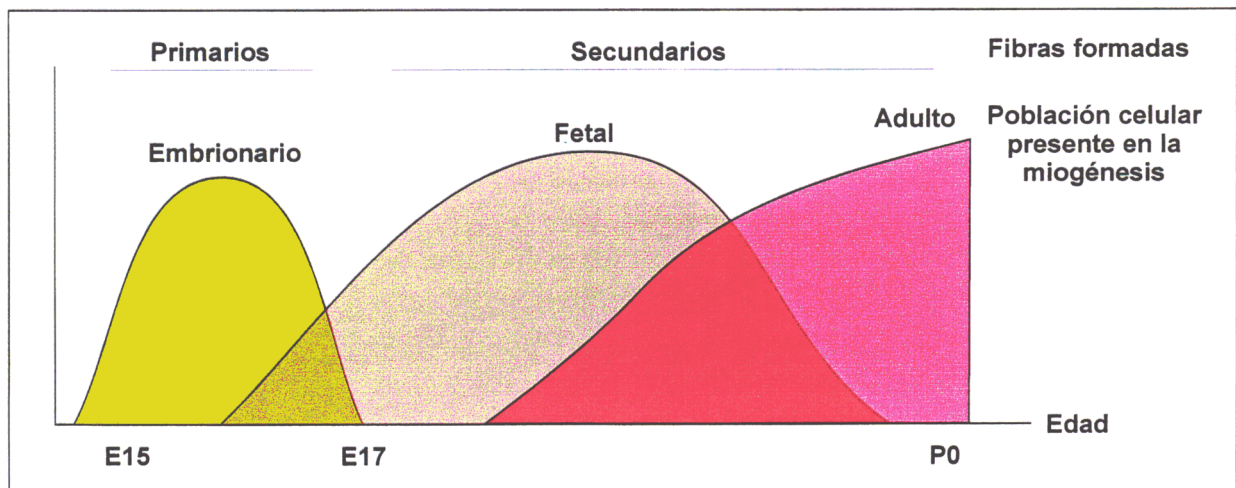


Figura 24.- Aparición de las diferentes poblaciones de células miogénicas durante la miogénesis prenatal de la rata. Modificado de Stockdale, 1992.

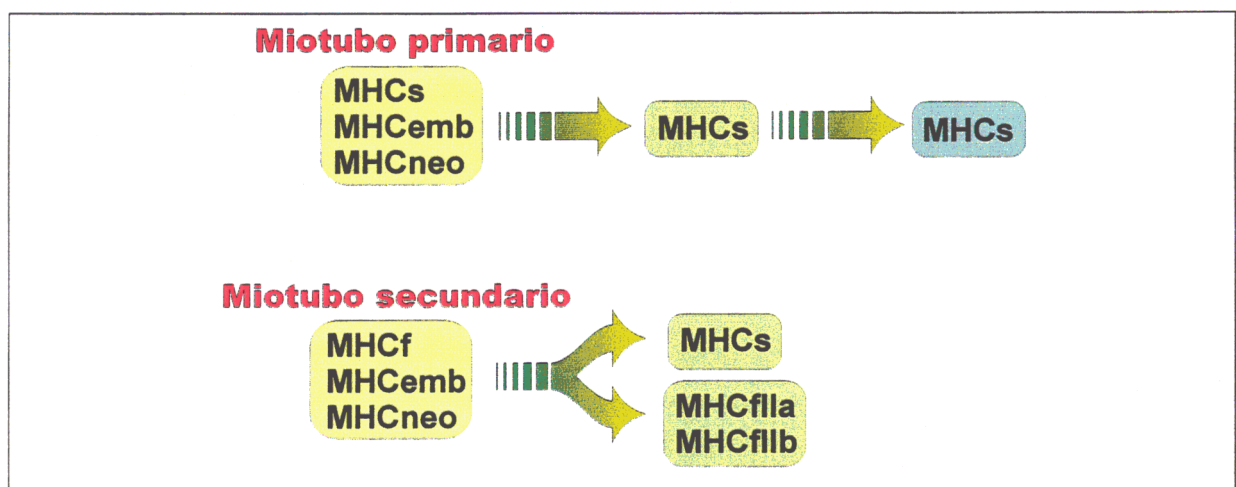


Figura 25.- Representación esquemática de la expresión de las diferentes isoformas de miosina, durante la miogénesis de las fibras extrafusales humanas.

Los filamentos polarizados de actina, se originan por adición de moléculas de actina G, nucleados desde las proximidades de moléculas de α -actinina, que a su vez se relacionan con otras proteínas de la futura línea Z, en la sarcómera inicialmente alineada, para ir formando la banda I. Su extremo "mas" tiene proteínas cap-Z, que sirven de unión con la α -actinina, para fijarse en el resto de proteínas que van a formar la línea Z (Schafer y cols., 1995). A la vez se va incrementando la alineación de filamentos gruesos en forma de agregados dispuestos en la zona que corresponde a la banda A pudiendo verse a veces un esbozo de la línea M (Briggs y cols., 1995).

Las moléculas de titina empiezan a detectarse en estadios tempranos inmediatamente después de la orientación longitudinal de la célula, mientras que las de nebulina solo se hacen patentes cuando se distinguen con claridad la línea Z y la estriación en las fibras secundarias (Behr y cols., 1994).

La formación del sistema de membranas requiere interacciones específicas membrana-membrana y membrana-citoesqueleto. El primer estadio coincide con la miofibrinogénesis temprana de los miotubos. La complejidad del sistema y su capacidad para liberar Ca^{2+} a través de la célula en desarrollo, es paralela a la formación de las miofibrillas (Takekura y cols., 1994). Al principio aparecen invaginaciones pequeñas de la membrana, que al ir progresando originan delgados túbulos T, en la periferia de las fibras, para avanzar posteriormente en todo su espesor. El RS empieza a ser abundante en el momento en que los túbulos T se invaginan hacia el interior y forma regularmente espacios cruzados con las estriaciones localizadas en las bandas I-Z-I. Hay tres situaciones claves en este proceso: a) interacción del RS con la línea Z, independiente del túbulo T, b) interacción del RS con el túbulo T para formar las triadas, independiente de las miofibrillas, y c) asociación de las triadas con las miofibrillas, en el límite de A-I (Flucher y cols., 1993). Durante todo el desarrollo de membranas se van detectando en ellas concentraciones crecientes de proteínas fijadoras, transportadoras y liberadoras de Ca^{2+} , que van a regular el acoplamiento excitación-contracción, desde los primeros estadios, tanto en fibras primarias como secundarias (Takekura y cols., 1994).

El crecimiento postnatal implica modificaciones de hipertrofia e hiperplasia de la fibra muscular, con características específicas dada su naturaleza sincitial. El crecimiento hipertrófico se produce por división de las células satélite, de manera asimétrica, y su fusión posterior a la célula muscular (Moss y Leblond, 1971). La longitud óptima (aquella con la que el músculo es capaz de producir la tensión isométrica máxima), se consigue por adición de sarcómeras en serie, principalmente en los extremos de la célula (Williams y Goldspink, 1978), que varían en número rápidamente dependiendo de la inmovilización o el ejercicio (Oudet y Petrovic, 1981; Tardieu y cols, 1981). El crecimiento hiperplásico se realiza por un aumento del número de células. Este es un hecho puesto en duda largo tiempo, insistiendo la mayoría de los autores en una estabilidad e incluso disminución en el número de fibras musculares en la vida

postnatal. Dicho número viene determinado genéticamente para cada especie animal y cada músculo, dependiendo tanto del peso corporal, como del propio músculo y la función que deba realizar (Layman y cols, 1980).

3.- HETEROGENEIDAD DE LAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS EXTRAFUSALES

3.1.- RECUERDO HISTÓRICO.

Debemos a Stefano Lorenzini (1678) la primera clasificación de fibras musculares, basándose en el color (Ciaccio, 1898), confirmada dos siglos más tarde por Ranvier (1873; 1874 a y b; 1880) que sugiere diferencias fisiológicas entre las fibras rojas y blancas, relacionando el color con la contracción rápida y lenta respectivamente. Así mismo observa una mayor afluencia de riego sanguíneo en el músculo rojo que en el blanco. Previamente, en 1857, Kölliker había descrito unos gránulos que se encuentran en el sarcoplasma de las fibras oscuras, aventurando la hipótesis de que tuvieran relación con el metabolismo propio de las fibras. Siguiendo en la misma línea, Grützner (1884) señala en los músculos de los vertebrados, la existencia de unas fibras delgadas y oscuras y otras más gruesas y de color claro, haciendo responsable de esta variación a dichos gránulos sarcoplásmicos. Retzius (1890) sugiere que estos gránulos corresponden a los sarcosomas, pero Knoll (1891), determinó su naturaleza lipídica y sostiene que la diferencia de color de las fibras viene dada por la diferente cantidad de protoplasma entre las miofibrillas, dividiéndolas en dos grandes grupos: unas ricas en protoplasma (protoplasma reiche) y otras pobres en protoplasma (protoplasma arme). También observa que hay músculos constituidos exclusivamente por fibras oscuras o rojos, otros por fibras claras o blancos y otros mixtos, que poseen ambas clases de fibras.

Lee y cols. (1916), estudiando en el gato los músculos extensor digitorum longus (EDL), gastronemius, soleus y diafragma, encontraron diferencias bioquímicas y fisiológicas entre ellos, pero no fueron capaces de demostrar una correlación entre esas variaciones y las características histológicas. Bullard (1919) confirma estos datos, al ser capaz de demostrar mediante la tinción con Sudán III, que los músculos están constituidos por fibras claras, oscuras e intermedias y que había una variación en la proporción y tamaño de las fibras que componían estos músculos. Denny-Brown (1929), con este mismo modelo experimental, observó también que las fibras oscuras tienen un alto contenido en lípidos, muy superior al contenido en las fibras claras, pero tampoco fue capaz de demostrar la correlación entre los hallazgos histológicos de las fibras y su velocidad de contracción.

Bensley y Hoerr (1934), introduciendo en sus estudios métodos de centrifugación diferencial, localizan ciertas enzimas en diferentes fracciones de fibras musculares,

como en las mitocondrias y los sarcosomas. Paul y Sperling (1952), relacionaron la densidad de mitocondrias y los procesos de actividad respiratoria, con los diferentes tipos de fibras, demostrando que el músculo blanco tiene un bajo contenido en ellas y por tanto, posee una baja actividad respiratoria, mientras que en el músculo rojo ocurría lo contrario, es decir, poseía una alta actividad respiratoria por la gran cantidad de mitocondrias. (Tabla I).

Tipos de fibras musculares		Autores
Rojas	Blancas	Lorenzini 1678 Ciaccio 1898
Contracción rápida Riego sanguíneo ++	Contracción lenta Riego sanguíneo +	Ranvier 1874
Gránulos sarcoplásmicos		Kölliker 1857
Delgadas y oscuras	Gruesas y pálidas	Grützner 1884
Gránulos sarcoplásmicos lipídicos +++ Ricas en protoplasma	Lípidos + Pobres en protoplasma	Knoll 1891
Mitocondrias +++ Actividad respiratoria +++	Mitocondrias + Actividad respiratoria +	Paul y Sperling 1952

Tabla I.- Primeros intentos de clasificación de las fibras musculares, basados en hallazgos morfológicos.

3.2.- DIFERENCIACIÓN HISTOQUÍMICA.

Con la llegada de las técnicas histoquímicas, que hacen posible localizar sistemas enzimáticos y otros constituyentes químicos a nivel celular, se abre un nuevo campo de experimentación, en el estudio de los distintos tipos de fibras que componen el músculo. Por las características metabólicas de este tejido, las enzimas que más interesaron en su estudio fueron las implicadas en la síntesis y degradación del glucógeno, oxidoreductasas e hidrolasas.

Basándose en el clásico método del azul de metileno para demostración de succino-deshidrogenasa (SDH), con modificaciones que mejoran su sensibilidad, varios autores comprueban su variación individualizada en las fibras musculares, y así, Semenoff (1935) presenta sus investigaciones en músculos de anfibios; Ligman y Rutemburg (1951) en los músculos de rata; Wachstein y Meisel (1955) hablan de una mayor proporción de fibras SDH⁺ en el diafragma y la reacción más intensa en corazón y lengua de rata y conejo; Buño y Germino (1958) llegan a los mismos resultados en la rata; Nachmias y Padykula (1958) demuestran que en el sóleo de la rata la reacción es uniforme e intensa en las fibras que lo componen, que son rojas, mientras que en el

bíceps femoris o tibialis anterior, que es un músculo mixto, había una marcada variación de actividad enzimática, con tinción más intensa en las fibras de menor diámetro, que a su vez contenían más mitocondrias por unidad de área. Paralelamente, George y Scaria (1958), siguiendo técnicas similares, consiguieron una alta correlación entre la actividad enzimática oxidativa en el músculo rojo y su alto contenido en mitocondrias. Wachstein y Meisel (1955), fueron los primeros en aplicar estos métodos al músculo humano, en material de autopsias y demostraron, igual que en otros mamíferos, la reacción más intensa a la SDH en las fibras de pequeño diámetro (Fazarinc y cols., 1995).

Los trabajos de Ogata (1958a, b, c) fueron especialmente clarificadores al utilizar métodos enzimáticos adicionales en músculos de peces, anfibios, aves y mamíferos. Con el método de la SDH reconoció tres tipos de fibras: a) Fibras blancas y gruesas con débil actividad enzimática; b) Fibras finas y rojas con gran actividad enzimática; y, c) Fibras intermedias en cuanto a tamaño y actividad enzimática. La proporción de las tres clases de fibras variaba según el músculo estudiado. Este mismo autor, utilizando métodos de citocromo-oxidasa, difosfopiridín-nucleótido-diaforasa (DPN) y trifosfopiridín-nucleótido-diaforasa (TPN), encontró variaciones similares, pero ni él, ni Beckett y Bourne (1958) en un estudio similar, consiguieron demostrar alguna correlación entre la actividad de la SDH y la citocromo-oxidasa. (Tabla II).

Características	Tipos de fibras musculares			Autores
	Rojas	Intermedias	Blancas	
Mit/superf.	+++	++	+	George y Scaria 1958
Diámetro fibra	Delgada	Mediana	Gruesas	Nachmias y Padykula 1958 Ogata 1958
Actividad Enz.:				Semenoff 1935
SDH	++++	++	+	Wachstein y Meisel 1955
Citocromo oxidasa	++	+	+	Nachmias y Padykula 1958
DPN-TPN	++++	++	+	Buño y Scaria 1958 Ogata 1958

Tabla II.- Primera clasificación de las fibras musculares basada en la correlación de imágenes morfológicas y hallazgos histoquímicos.

A partir de este momento empiezan a aparecer numerosas clasificaciones, según los hallazgos de diferentes grupos de investigadores. Dubowitz y Pearse (1960a y b) mediante el estudio de la actividad fosforilasa y varios enzimas oxidativos, proponen una clasificación en dos grandes grupos, tanto en animales de experimentación como en el hombre. Unas fibras llamadas tipo I, con alta actividad oxidativa y débil actividad glicolítica, y otras fibras denominadas tipo II, con baja actividad oxidativa y alto grado

de actividad glicolítica. También fueron observadas fibras intermedias, pero no las dieron entidad propia. (Tabla III).

Características enzimáticas	Tipos de fibras	
	Tipo I	Tipo II
Actividad oxidativa	Alta	Baja
Actividad glicolítica	Baja	Alta

Tabla III.- Clasificación de los tipos de fibras musculares según Dubowitz y Pearse (1960).

Engel (1962), continuando con la línea iniciada por Wachstein y Meisel (1955), en material de autopsias y biopsias humanas, encontró también dos tipos de fibras, pero tomaba como base la diferente actividad ATPásica miofibrilar, hablando de tipo 1, con baja actividad ATPásica y tipo 2, con alta actividad, correspondiendo solo en parte a los tipos de fibras puestos de manifiesto mediante enzimas oxidativos. (Tabla IV).

Características enzimáticas	Tipos de fibras		
	Tipo 1	Tipo 2	
	Baja	Alta	
Actividad ATPásica		pH 4,6 Tipo 2B y 2C	pH 4,3 Tipo 2C pH 9,4 Tipo 2A, 2B y 2C

Tabla IV.- Clasificación de los tipos de fibras basada en su actividad ATPásica, Engel (1962); Brooke y Kaiser (1973).

Stein y Padykula en ese mismo año (1962), y en contraposición con los autores anteriores, sugirieron un sistema más complejo, reconociendo tres tipos de fibras que denominaron A, B y C, basándose en el tamaño y distribución de mitocondrias y en la reacción de la SDH. Dichos autores, además de la técnica antes mencionada pusieron en juego también la reacción ATPásica, esterásica y glicogénica de las fibras, para la mejor identificación y agrupación de los tres tipos antes mencionados (Tabla V).

En un intento de correlación entre las reacciones histoquímicas y las propiedades fisiológicas de velocidad de contracción de las diferentes fibras musculares, Guth y Samaha (1969), evaluaron bioquímicamente las propiedades de la miosín ATPasa, y parecieron estar de acuerdo con la reacción histoquímica para la ATPasa, proponiendo la siguiente denominación: a) "Rápida-contracción blancas", caracterizadas por su marcada actividad ATPásica y negativa para la nicotín-adenín-dinucleótido tetrazolium reductasa (NADH-TR); b) "Rápida contracción roja" con marcada actividad ATPásica y NADH-TR y, por último, c) "Lenta-contracción intermedias", que poseían una baja

actividad ATPásica e intermedia actividad NADH-TR. Barnard y cols. (1971) argumentaron que la velocidad de contracción guardaba una relación más estrecha con la actividad ATPásica que con la NADH-TR. Las fibras que poseían una alta reactividad ATPasa eran de contracción más rápida, mientras que las de reacción más débil eran a su vez más lentas en su contracción.

Tipos de fibras	Características
A o blancas	SDH: red escasa y lineal de pequeñas partículas ATPasa +
B o intermedias	SDH: Red más abundante y uniforme ATPasa -
C o rojas	SDH: Red muy abundante de partículas muy grandes concentradas en las zonas subsarcolémica ATPasa +

Tabla V.- Clasificación de los tipos de fibras musculares según Stein y Padykula (1962).

En la década de los setenta, Brooke y Kaiser (1970) usando la técnica de la ATPasa y preincubando, con variación del pH, demostraron la existencia de varios subtipos de fibras dentro de las de tipo 2 de Engel (1962). Preincubando a pH 4,6, desaparecía la actividad ATPásica de unas fibras que denominaron 2A. Variando el pH a 4,3 desaparecía la actividad de otras fibras, además de las anteriores y las denominaron 2B y por último quedaban dentro del tipo 2, unas fibras que no se inhibían con ninguno de los pH anteriores, denominándolas 2C. Un año después, Brooke y cols. (1971) observaron que en los animales jóvenes la primera diferenciación de las fibras musculares se realiza en las fibras tipo 1 y tipo 2C, mientras que en los animales adultos, el tipo 2C se diferencia sucesivamente en 2B y 2A. Posteriormente (1973) Brooke y Kaiser vuelven a plantearse si las fibras 2C son un subtipo individualizado o son sólo precursoras de otros tipos de fibras. (Tabla IV).

Recopilando todos los datos anteriores, Peter y cols., (1972) proponen una nueva clasificación para los tres tipos de fibras clásicos: oxidativa lenta (SO), glicolítica rápida (FG) y glicolítica oxidativa lenta (FOG). (Tabla VI). Dubowitz y Brooke (1973), trataron de hallar una correlación significativa en todos estos parámetros y propusieron una clasificación amplia como base para posteriores estudios. (Tabla VII).

Posteriormente, numerosos autores han llevado a cabo estudios sobre la estimación de la actividad enzimática en fibras microdisecadas (Spamer y Pette, 1977; 1979; Lowry y cols, 1978; Hintz y cols, 1980; Nemeth y cols, 1981), o por medición microfotométrica de la reacción enzimática en cortes transversos seriados (Spurway, 1981; Nemeth y Pette, 1981; Reichmann y Pette, 1982), que demuestran una correlación entre el análisis bioquímico y las características histoquímicas de los

distintos tipos de fibras. Pero después de todo lo anteriormente expuesto y tomando como base la clasificación de Dubowitz y Pearse (1960 a y b), y las posteriores

Tipos histoquímicos de fibras					Autores
	1	2A	2B	2C	
Nomenclatura fisiológicas	Contracción lenta Intermedias	Contracción rápida roja	Contracción rápida Blanca		Barnard y cols. 1971
	SO Contracción lenta Oxidativa	FOG Contracción rápida Oxidativa, glicolítica	FG Contracción rápida Glicolítica		Peter y cols. 1972
	S Contracción lenta	FR Contracción rápida Resistente a la fatiga	FF Contracción rápida Sensible a la fatiga		Burke y cols. 1971, 1973

Tabla VI.- Correlación entre la nomenclatura fisiológica y las características histoquímicas de los diferentes tipos de fibras musculares.

Apariencia anatómica	Roja o blanca Oscura o clara Alta o baja granulosidad Rica o pobre en protoplasma Diferencias subcelulares al microscopio electrónico
Funcionamiento fisiológico	Contracción lenta o rápida Alta o baja resistencia a la fatiga
Propiedades bioquímicas	Alta o baja actividad respiratoria Alto o bajo contenido en constituyentes químicos enzimáticos
Características histoquímicas	Alto o bajo contenido en enzimas Enzimas situados en las inmediaciones o en las fibras

Tabla VII.- Cuadro de correlación entre diferentes parámetros propuesto por Dubowitz y Brooke (1973).

subdivisiones de Brooke y Kaiser (1970), en la actualidad se acepta la siguiente nomenclatura para los distintos tipos de fibras: primeramente dos grandes grupos denominados fibras tipo I y tipo II, y dentro de este segundo grupo existe una segunda subdivisión que correspondería a las fibras tipo IIa, IIb y IIc. Aunque trabajos de Ingjer (1979 a y b), Staron y cols (1983) y posteriormente Biral y cols (1988), describen dos subgrupos más, tipo IIab y IIac, dentro del grupo de fibras tipo II, ellos mismos en sus conclusiones, apuntan la teoría de la posible existencia de un equilibrio dinámico entre las fibras tipo IIa y IIb y estos dos nuevos grupos, corresponderían a estados de transición entre uno y otro tipo. (Tabla VIII).

Reacción	Tipos de fibras musculares			
	1	2A	2B	2C
ATPasa de rutina(pH 9,4)	+	+++	+++	+++
ATPasa preincubada a pH 4,6	+++	0	+++	+++
ATPasa preincubada a pH 4,3	+++	0	0	++
NADH-TR	+++	++	+	++
SDH	+++	++	+	++
Menadiona α -glicerofosfato	0	++	++	+
PAS	+ o ++	+++	++	++
Fosforilasa	0 o +	+++	+++	+++

Tabla VIII.- Clasificación enzimática actual de los distintos tipos de fibras musculares

3.3.- ESTUDIOS INMUNOCITOQUÍMICOS.

Tanto los filamentos finos y gruesos, como los discos Z y las proteínas asociadas, forman un complejo grupo de componentes proteicos, la mayoría de los cuales existen en múltiples isoformas (Schiaffino y Reggiani, 1996), por lo que la estructura y composición bioquímica de las sarcómeras, tiene un alto grado de variabilidad. Las proteínas de los miofilamentos y su concentración en este tejido específico, está regulado por genes isomórficos, en relación con la diferenciación de los tipos de fibras musculares. Cada familia de isoformas, refleja la existencia de la correspondiente familia multigénica, que muestran secuencias altamente homólogas y similar estructura exón-intrón y presumiblemente derivan de un mismo gen ancestral común. Las variantes analizadas presentan pues, el mismo origen genético, similar estructura proteica y similar papel funcional en el proceso contráctil (Wang y Rubenstein, 1992). Estas isoformas aparecen normalmente durante el desarrollo o pueden ser inducidas por influencias neuronales y hormonales (Bandman, 1992). La intercambiabilidad de las isoformas de miofibrillas, está claramente demostrada en experimentos de extracción proteica, en fibras musculares aisladas (Moss, 1992).

En relación con el filamento grueso (tabla IX), dentro de la clase de miosinas II, se encuentran dos grandes grupos de isoformas, una para el músculo liso y las células no musculares, diferentes de las miosinas I, y otra para el músculo estriado y cardíaco (Pette y Staron, 1990). Entre las familias de multigenes que regulan la expresión de las isoformas esqueléticas, se encuentran los genes MHC y los genes MLC ambos reguladores y esenciales (Robbins y cols., 1986). Los genes MHC originan nueve RNAm diferentes, que se van a traducir en nueve isoformas de cadenas pesadas (Moore y

cols., 1992). Teniendo en cuenta que en las cadena ligeras se han podido caracterizar también seis isoformas básicas diferentes, se han clasificado en la actualidad según la propuesta de Schiaffino y Reggiani (1996).

La molécula de titina, muestra propiedades diferentes en diferentes músculos, especies y etapas del desarrollo, por lo que parece que existen múltiples isoformas, que todavía no están caracterizadas (Fürost y cols., 1988). En cuanto al resto de proteínas asociadas a este filamento, se sospecha que la proteína X puede ser una isoforma de la proteína C, igual que ocurre entre la proteína M y la miomesina, pero la existencia de estas isoformas, no está bien establecida (Bennett y cols., 1986).

En los filamentos finos (Tabla X), existen seis isoformas de actina (Vandekerckhove y cols., 1986), dos para músculo liso, dos para citoesqueleto y dos para músculo estriado, la α -actina esquelética y la α -actina cardíaca, todas ellas codificadas por diferentes genes. La secuencia de aminoácidos de las formas estriadas, es casi idéntica y su estructura es constante en todos los mamíferos (Vandekerckhove y Weber, 1997). La expresión varía dependiendo de la especie y el momento del desarrollo. En el hombre parece que hay una coexpresión de las dos isoformas tanto en el músculo esquelético como en el cardíaco (Blanchard y cols., 1989).

La tropomiosina presenta dos isoformas, α -tropomiosina y β -tropomiosina, que a su vez pueden combinarse entre ellas para formar dímeros $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ y $\alpha\beta$ (Cummins y Perry, 1974). En los músculos estriados de los mamíferos, aparecen tres combinaciones, TM- β , durante el desarrollo, TM- α f en el músculo cardíaco y esquelético y TM- α s en el esquelético solo (Salviati y cols., 1983).

Para codificar las diferentes isoformas de troponina, hay varios genes implicados, cada uno de los cuales genera un gran número de transcritos utilizando diferentes exones (Greaser y Gergely, 1973). Los genes TnC-f y TnC-s originan una superfamilia de proteínas entre las que encontramos la calmodulina, parvalbúmina, TnC-f (4 uniones para Ca^{2+}) y TnC-s (1 unión para Ca^{2+}) (Nakayama y Kretsinger, 1994). Para la TnT existen hasta 64 isoformas originadas por tres genes, TnT-f, TnT-s y TnT-c (Abe y cols., 1986). También hay tres genes que codifican para TnI-f, TnI-s y TnI-c y las isoformas generadas solo varían ligeramente en la región NH_2 -terminal (Grabarek y cols., 1992).

Con respecto al resto de proteínas asociadas a este filamento, sabemos que la nebulina en el hombre está codificada por múltiples genes, que originan una gran variedad de isoformas, pero no están totalmente definidas (Labeit y Kolmerer, 1995). La expresión de isoformas de α -actinina está codificada por cuatro familias de genes, para músculo estriado, cardíaco, liso y células no musculares (Blanchard y cols., 1989). No hay constancia de isoformas de tropomodulina (Fowler y cols., 1993).

ISOFORMA	LOCALIZACIÓN	REFERENCIA
MHC- β s	Músculo esquelético adulto y ventrículo.	Lompré y cols (1984)
MCH-2A	Músculo esquelético adulto.	Pierobon-Bormioli (1981)
MHC-2X	Músculo esquelético adulto.	Smerdu y cols (1994)
MHC-2B	Músculo esquelético adulto.	Danieli-Betto y cols (1986)
MHC-emb	Músculo esquelético en desarrollo.	Whalen y cols (1981)
MHC-neo	Músculo esquelético en desarrollo.	
MHC- α	Maseteros y aurículas.	Butler-Browne y cols (1988)
MHC-ea	Músculos extraoculares y laríngeos.	Sartore y cols (1987)
MHC-m	Músculos masticatorios en carnívoros	Butler-Browne y cols (1982)
MLC-1f	Músculo esquelético adulto.	Nabeshima y cols (1984)
MLC-3f	Músculo esquelético adulto.	Periasamy y cols (1984)
MLC-1s/v	Músculo esquelético adulto y ventrículo.	Hallstone y Gunning (1990)
MLC-1s/a	Músculo esquelético embrionario y aurícula. Músculo esquelético adulto. Músculo liso y células no musculares.	
MLC-1emb/a	Músculo esquelético en desarrollo y aurícula	Robert y cols (1984)
MLC-2f	Músculo esquelético adulto en mamíferos.	Hoh y cols (1978)
MLC-2s	Transitorio en embrión humano.	
MBP-C-fast	Músculo esquelético rápido	Bennet y cols (1986)
MBP-C-slow	Músculo esquelético lento	
MBP-H	Músculo esquelético	
Proteína M	Músculo esquelético y cardíaco	
Miomesina	Músculo esquelético y cardíaco	
Titina (múlt. Isof.)	Músculo esquelético y cardíaco	Fürst y cols (1988)

Tabla IX.- Isoformas de proteínas miofibrilares que constituyen el filamento grueso, y su patrón de expresión en el músculo estriado de mamíferos.

Como estamos viendo, las isoformas de proteínas miofibrilares, muestran una distribución específica en cada tejido, e incluso pueden utilizarse como marcadores específicos para diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas. Esta distribución de las isomiosinas se ha estudiado exhaustivamente en el músculo, utilizando anticuerpos monoclonales (MoAb) y policlonales (PoAb). Los PoAb aplicados al músculo humano,

han demostrado la existencia de tipos de fibras comparables con los hallados histoquímicamente (Billeter y cols, 1980). Thornell y cols., (1984) mostró que los PoAb-miosina pueden revelar diferencias entre fibras que fueron histoquímicamente bastante uniformes, hecho que ya habían comprobado Gauthier y Lowey (1979), demostrando heterogeneidad para PoAb en fibras homogéneas en músculos de diferentes animales.

ISOFORMAS	LOCALIZACIÓN	REFERENCIA
Actina- α cardíaca	Músculo esquelético Músculo cardíaco	Blanchard y cols. (1989)
Actina- α esquelética	Músculo esquelético Músculo cardíaco	
TnC-f	Músculo esquelético rápido	Nakayama y Kretsinger (1994)
TnC-s/c	Músculo esquelético lento Músculo cardíaco	
TnT-1f TnT-2f TnT-3f TnT-4f TnT-fetales	Músculo esquelético lento Músculo en desarrollo	Abe y cols. (1986)
TnT-1s TnT-2s	Músculo esquelético lento	
TnT-1c TnT-2c TnT-3c TnT-4c	Músculo en desarrollo Músculo cardíaco	
TnI-f	Músculo esquelético lento Músculo cardíaco en desarrollo	
TM- α f	Músculo esquelético rápido Músculo cardíaco	Salviati y cols. (1983)
TM- α s	Músculo esquelético lento	
TM- β	Músculo esquelético Músculo cardíaco	
α -actinina-s/c	Músculo esquelético lento Fibras 2A rápidas Músculo cardíaco	Blanchard y cols.(1989)
α -actinina-f	Músculo esquelético rápido	

Tabla X.- Isoformas de proteínas miofibrilares que constituyen el filamento fino, y su patrón de expresión en el músculo estriado de mamíferos.

Pierobon-Bormioli (1981), fue capaz de caracterizar selectivamente las fibras musculares rápidas-blancas (tipo IIb) y rápidas-rojas (tipo IIa), en músculo de rata, usando unos anticuerpos específicos para músculo rápido-blanco y rápido-rojo, a partir de suero de cobaya incubado en conejo. Las fibras tipo I fueron identificadas con MoAb para miosina de músculo soleus. En sus conclusiones proponen la existencia de dos grupos de fibras con doble reactividad.

En la actualidad, los métodos histoquímicos se siguen utilizando paralelamente a los inmunohistoquímicos, como podemos ver en los trabajos de Santana-Pereira y cols, (1995) que han demostrado que la especificidad de la ATPasa miofibrilar y los MoAb anti MHC humana, (MHCI, IIA, IIB y IIA+IIB), es superponible y que en aquellas fibras con reacción ATPasa intermedia, aparece una coexpresión para diferentes isoformas de MHC, en cantidades variables dentro de cada una. En la misma línea, Staron (1997) intenta hacer un estudio sobre la distribución de los tipos de fibras en los músculos del cuerpo humano, a lo largo de su desarrollo.

Sin embargo, debemos recalcar que una misma isoforma puede expresarse en músculos diferentes, e incluso en células no musculares. En la tabla IX vemos como algunas formas cardíacas, pueden ser expresadas en algún estadio evolutivo en el músculo esquelético embrionario, y viceversa (Starr y cols. 1985; Kelly y cols. 1995). También hemos mencionado que un mismo músculo, dependiendo del tipo de fibras que lo integran, expresará una proporción diferente de isoformas y que incluso en una sola célula pueden coexistir varias isoformas, que de alguna forma van a influir sobre su capacidad funcional (Santana-Pereira y cols. 1995).

3.4.- VARIACIONES MORFOLÓGICAS EN LOS DIFERENTES TIPOS DE FIBRAS.

Varios protocolos experimentales se encaminaron a correlacionar los hallazgos ultraestructurales con la histoquímica y fisiología de los distintos tipos de fibras, en el hombre y otros vertebrados. El uso de técnicas estereológicas cuantitativas (Eisenberg y Kuda, 1974; 1975 y 1976), los cortes ultrafinos (Sjöström y Squire, 1977a y b) y el estudio con microscopía electrónica de barrido (Ogata y Yamasaki, 1985), han aportado datos morfológicos absolutamente fiables, que concuerdan con los datos histoquímicos.

3.4.1.- Variaciones en la superficie de corte de la fibra.

Los primeros estudios se centraron en el diámetro de los distintos tipos de fibras, con resultados muy contradictorios, dependiendo de si el estudio se realizaba en hombre o en mujer (Brooke y Engel, 1969). Jennekens y cols. (1971), establecieron que las fibras tipo I tienen un diámetro bastante constante, mientras que las tipo II pueden variar dependiendo del músculo estudiado y del esfuerzo muscular realizado. En la actualidad

este dato no se utiliza para clasificar las fibras, pero sí para valorar la calidad de un entrenamiento o para medir el grado de recuperación tras una lesión neuromuscular.

3.4.2.- Variaciones en las mitocondrias.

Los primeros datos sistematizados en el estudio de este apartado, los encontramos en los trabajos de Shafiq y cols (1966), que muestran diferencias morfológicas concretas entre los distintos tipos de fibras: En el tipo I, las mitocondrias eran mayores tanto en número como en tamaño y en la complejidad de sus crestas. Aparecen como una ancha banda en la zona subsarcolémica y en agregados perinucleares. Otra localización constante es en las zonas intermiofibrilares, en forma de columnas paralelas a las miofibrillas. En el tipo II, son mucho menos abundantes, no existen las columnas interfibrilares, encontrando algunos elementos aislados. No hay agregados subsarcolémicos, excepto en las regiones perinucleares. Estos datos fueron confirmados más tarde por numerosos autores, en varias especies animales y en el hombre (Ogata y Murata, 1969a y b; Gauthier, 1969; 1970; Schiaffino y cols, 1970).

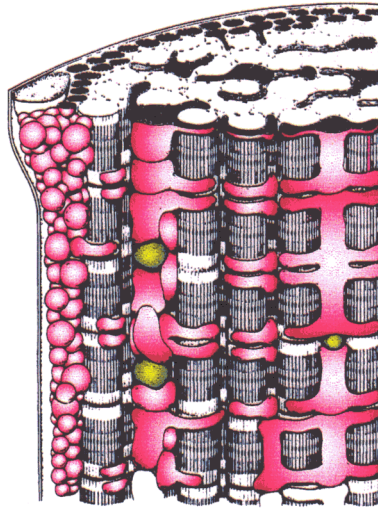
Ogata y Yamasaki (1985), muestran una definición exacta de la imagen que aporta la organización mitocondrial en las distintas fibras musculares (Figura 26). Distinguen dos poblaciones mitocondriales: a) Las Subsarcolémicas, de morfología redondeada, de gran tamaño, que aparecen en acúmulos densos bajo la membrana, siendo más numerosas en la zona perinuclear. Algunas de estas mitocondrias que están en contacto con la banda I de la miofibrillas, emiten una prolongación a este nivel. Su tamaño y número va disminuyendo de las fibras rojas a las intermedias y a las blancas. b) Las mitocondrias columnares intermiofibrilares, que vistas con microscopio electrónico de barrido, emiten ramas o prolongaciones bilaterales, que rodean las miofibrillas a ambos lados de algunas líneas Z, y se denominan mitocondrias-limitantes-bandas I, para diferenciarlas de otras redondeadas y sin prolongaciones que se localizan entre las miofibrillas a nivel de la banda I. Su presencia depende también del tipo de fibra, disminuyendo desde las tipo I a las tipo II, donde están prácticamente ausentes.

3.4.3.- Variaciones en las miofibrillas.

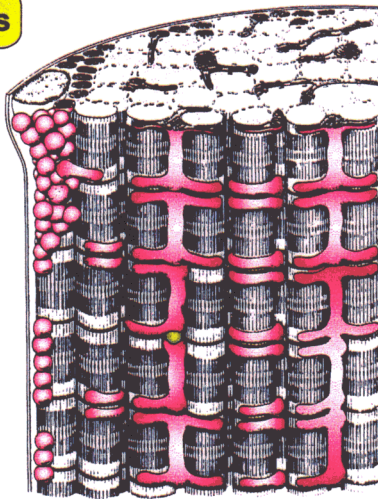
Las primeras aportaciones solo hablaban de una clara definición morfológica de la miofibrillas en las fibras tipo I, separadas por abundante citoplasma y de la separación irregular entre las miofibrillas de las células tipo II (Dietert, 1965).

Garamvölgyi (1972), en un amplio protocolo con varias especies de mamíferos, determinó que el tamaño de la línea Z, era el criterio morfológico más fiable para clasificar las fibras musculares, pero posteriormente Sjöström y Squire (1977) incluyeron la apariencia de la línea M como una característica de las diferentes fibras musculares. En la fibras tipo I, la línea Z es más ancha y la línea M tiene cinco puentes lineales muy

Fibras tipo I



Fibras intermedias



Fibras tipo II

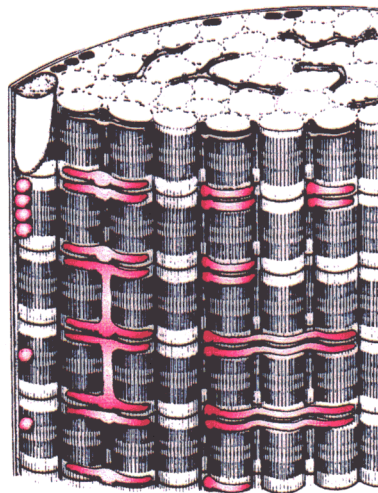


Figura 26.- Representación esquemática de la organización tridimensional mitocondrial en los tres tipos de fibras musculares esqueléticas. Modificado de Ogata y Yamasaki, 1985.

marcados. Las tipo IIa tienen líneas Z intermedias, tres puentes densos en la línea M y otros dos poco marcados. En las tipo IIb la línea Z es más estrecha, persisten los tres puentes marcados de la línea M y los otros dos son muy débiles o están ausentes (Sjöström y cols, 1982).

3.4.4.- Variaciones en el retículo sarcoplásmico.

Las cisternas del RS también presentan variaciones dependiendo del tipo de fibra, aunque según Shafiq y cols (1966), la cantidad de RS no puede ser utilizada como factor único de identificación. Las fibras rojas presentan una elaborada red de túbulos estrechos, localizada en la región de la banda H (Gauthier, 1970), mientras que en las tipo II se presenta como un empaquetamiento más compacto de túbulos anchos, dispuestos paralelamente. Para Ogata y Murata (1969a y b), este tipo de fibras siempre tiene más cantidad de retículo sarcoplásmico, incluso si se estudia en fibras poco desarrolladas (Figura 27).

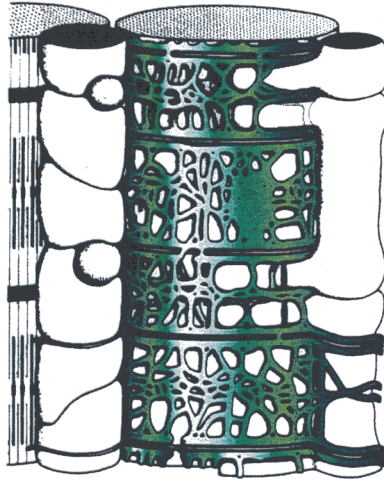
La acumulación de calcio en las vesículas sarcotubulares es idéntica en las fibras rojas y blancas y más baja en las fibras intermedias (Fiehn y Peter, 1971, Salvati y cols, 1983). Este hecho también se pone de manifiesto cuando al estudiar la oligomerización de la calsecuestrina, Maguire y cols. (1997) han demostrado que el sistema regulador de la concentración de Ca^{2+} es similar en funcionamiento en todas las fibras, pero con tendencia a acumular más en las fibras de contracción rápida.

3.4.5.- Variaciones en la placa motora.

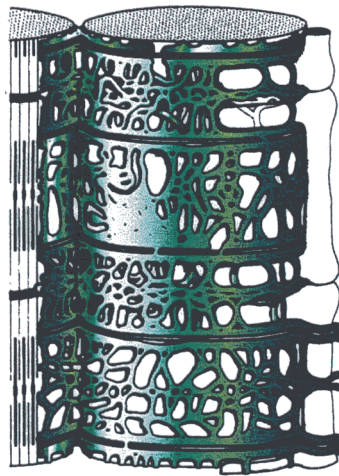
Siempre ha existido un confuso panorama en el análisis de las diferencias morfológicas y estructurales de la placa motora, dependiendo del tipo de fibra estudiado. El primero en aportar datos valorables fue Ogata (1965), que utilizando técnicas de acetilcolinesterasa y SDH, demostró cómo el aparato mioneural presenta un gran tamaño y desarrollo, con una complicada estructura, en las fibras blancas, mientras que en las fibras rojas era menor, menos complicado y bastante compacto. Las fibras intermedias presentaban características intermedias entre los dos tipos de fibras anteriores. Las hendiduras primarias son más numerosas, profundas, regulares y ramificadas en las fibras blancas que en las rojas (Ogata y cols, 1967; Ogata y Murata, 1969a y b). Lo mismo encontraron los demás investigadores en los nuevos datos que fueron aportando.

Los botones terminales fueron el objeto de estudio de Raberger (1971), en cortes teñidos con acetilcolinesterasa y Sudán negro B, determinando que su número era de 30-90 en las fibras blancas y de 1-5 en las rojas, presentando además un menor tamaño.

Fibras tipo I



Fibras intermedias



Fibras tipo II

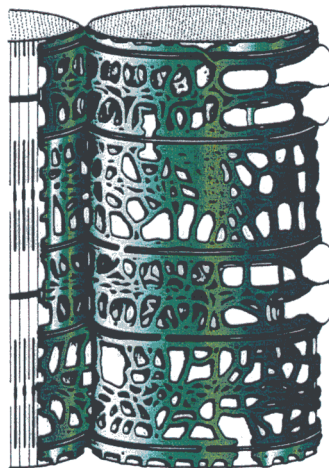


Figura 27.- Representación esquemática de la estructura tridimensional del sistema T y del RS en los tres tipos de fibras musculares esqueléticas. Modificado de Ogata y Yamasaki, 1985.

Las dimensiones del axón se consiguieron con tinciones de azul de metileno. En las fibras blancas es largo y con numerosas y diminutas varicosidades, mientras que en las rojas es corto y las varicosidades son grandes, aunque aparecen en menor número (Korneliussen y Waerhaug, 1973; Waerhaug y Korneliussen, 1974).

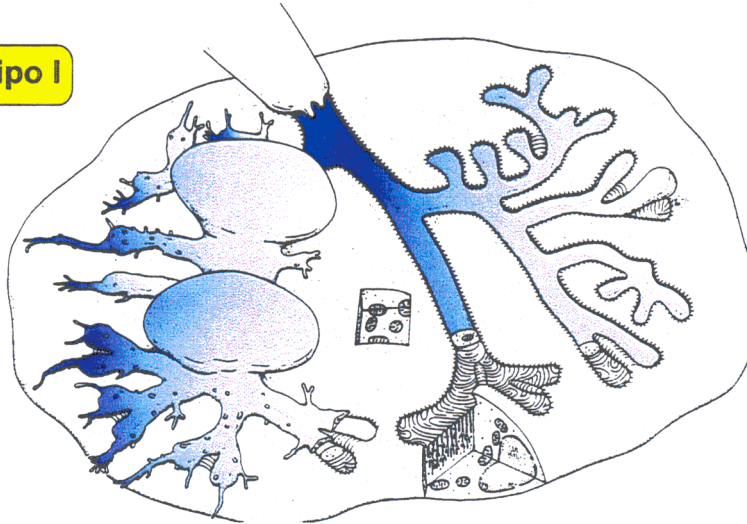
La determinación de la superficie axoplásmica corrió a cargo de Padykula y Gauthier, 1970), encontrando una considerable diferencia a favor de las fibras blancas (2,3), seguidas de las intermedias (1,5) y por último las intermedias (1). Posiblemente tan gran superficie es necesaria para transmitir el impulso nervioso en la rápida contracción de la fibra blanca (Murata y Ogata, 1969).

Los valores de longitud y superficie de membrana presináptica por cada axón terminal y de la proporción área mitocondrial / axón terminal, no resultaron estadísticamente significativas entre los tres tipos de fibras (Santa y Engel, 1973), así como tampoco la hubo entre las dimensiones de las vesículas sinápticas (Galvas y cols, 1982).

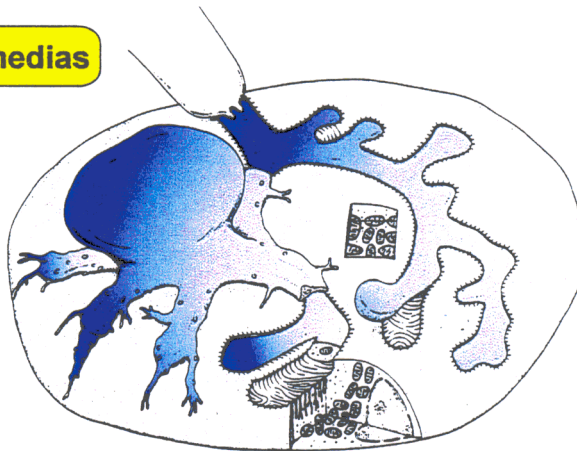
En la actualidad Ogata y Yamasaki (1984; 1985), mediante el microscopio electrónico de barrido, describen la estructura tridimensional de las placas motoras de los distintos tipos de fibras (Figura 28). La placa motora de las fibras blancas es alargada, las hendiduras sinápticas primarias contienen en su fondo pequeñas hendiduras secundarias. Las hendiduras primarias están separadas entre sí por crestas de sarcolema y pequeñas concavidades semiesféricas se encuentran a lo largo de su curso o en las regiones terminales. En la superficie de estas hendiduras aparecen las hendiduras secundarias, con un intervalo de 0,4 μm , dispuestas perpendicularmente al eje mayor de las primarias, aunque ocasionalmente pueden verse alineadas paralela u oblicuamente a éstas, especialmente en las ramificaciones. En las concavidades tienden a disponerse radialmente. Las hendiduras secundarias, son más numerosas, profundas y ramificadas, en las fibras blancas que en los otros tipos de fibras (Ogata, 1988). El nervio preterminal entra en la placa motora y se divide en tres o cuatro ramas en este tipo de fibra. El axón terminal es largo pero más delgado que en las fibras rojas o intermedias. Pequeños botones terminales se encuentran a lo largo del axón terminal, acabando dentro de las pequeñas concavidades semiesféricas de las hendiduras primarias. Dichos botones son más numerosos pero mas pequeños en las fibras blancas.

El número de células de Schwann varía dependiendo de la superficie de la placa, estando presentes en número de 3-4 en esta localización (Desaki y Uehara, 1981). Existen procesos citoplásmicos de estas células que cubren los canales de las hendiduras primarias, conteniendo en su interior el axón terminal. Estos procesos presentan pequeñas proyecciones digitiformes en sus zonas laterales y en las terminales que se sellan con la superficie del sarcolema (Ogata y Yamasaki, 1984).

Fibras tipo I



Fibras intermedias



Fibras tipo II

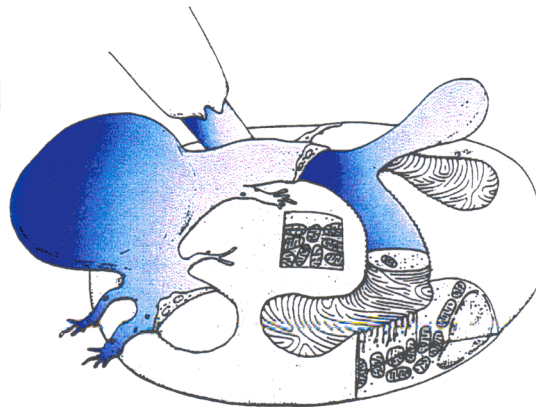


Figura 28.- Representación esquemática de la organización tridimensional de las placas motoras en los tres tipos de fibras musculares esqueléticas. Modificado de Ogata y Yamasaki, 1985.

Aunque la estructura básica tridimensional es la misma en todos los tipos de fibras, el conjunto morfológico de la placa motora de la fibra roja, es más simple y pequeño. Las hendiduras primarias abrazan anchas crestas del sarcolema situado en la parte central de la placa motora. Estas hendiduras son más anchas y cortas que las anteriores y a lo largo de su curso o en los terminales existen grandes pero escasas y poco profundas concavidades. La distancia entre las hendiduras secundarias es la misma que en las fibras blancas. Los axones terminales son más gruesos y cortos que en las fibras blancas. Así mismo los botones terminales que encajan en las hendiduras sinápticas son gruesos y menos numerosos. Normalmente en las fibras rojas encontramos una sola célula de Schwann, en la superficie de la placa motora. En cuanto al tamaño y estructura de la placa motora de las fibras intermedias, como ocurría en casos anteriores, se encuentran entre las fibras rojas y las blancas, aunque en su superficie solemos encontrar dos células de Schwann (Ogata y Yamasaki, 1985). Estos datos han sido corroborados posteriormente por Prakash y cols. (1996) y Siek y Prakash (1997), utilizando técnicas de inmunofluorescencia, combinadas con microscopía confocal.

3.4.6.- Variaciones en la vascularización.

Los primeros estudios se encaminaron a determinar el número de capilares por fibra, o por unidad de área (Hudlicka, 1973 y 1980). El tamaño de cada músculo puede suponer un inconveniente a la hora de establecer una relación entre la composición celular y el tamaño de los vasos que lo nutren, sin embargo, el número de capilares en la superficie de corte transversal, puede aportar información de importancia para conocer la fisiología capilar del músculo esquelético.

La clasificación de Ranvier (1874 a y b) en músculos blancos y rojos, estaba basada fundamentalmente en el grado de capilarización. Romanul y Pollock (1969), estudiaron en varias especies animales, incluyendo la humana, la relación existente entre el número de capilares y la capacidad oxidativa de la fibra muscular, demostrando diferencias entre los tipos ST y FT, de modo que la variación de tamaño influye sobre el número de capilares. Las fibras ST son de menor tamaño que las FT, con una densidad capilar más alta en las primeras.

En sujetos no entrenados, el área de aporte capilar puede ser del 20-30% mayor para fibras FTb y del 10-20% mayor para FTa, que para ST (Andersen, 1975. Andersen y Kroese, 1978. Aniansson y cols, 1981. Harri, 1977. Henderson y cols, 1970. Nygaard, 1981. Nygaard y Nielsen 1978. Saltin y cols, 1977). Los valores absolutos varían considerablemente entre diferentes personas y entre sus distintos músculos. Para Sjogaard (1982). (Esto es una comunicación personal pero no a mí), utilizando músculos en los que hubiera un claro predominio de un tipo de fibra muscular, el número de capilares varía de 1-4 en FT y 4-11 en ST.

La relación área fibrilar / área capilar, se estimó en 3:1 para ST y FT respectivamente (Gray y Renkin, 1978. Renkin y cols, 1981). En el hombre, para una medida de longitud capilar media de 1000 μm y un diámetro medio de 6 μm , lleva a una superficie transversal capilar de 0,62 cm^2/cm^2 de músculo, en un músculo con 330 capilares/ mm^2 . En músculos con predominio de fibras FT, este valor puede ser menor, y mayor si el predominio es de ST. Basados en valoraciones similares, el volumen capilar en el músculo esquelético humano sería aproximadamente del 1% del total. (Pappenheimer y cols, 1951. Aniansson y cols, 1981. Gray y Renkin, 1978. Mellander, 1981. Yamaki y cols, 1976).

4.- FISIOLÓGÍA.

4.1.- MECANISMO BÁSICO DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR.

Como ya hemos dicho, la función del músculo es contraerse para desarrollar un trabajo mecánico. Esta contracción tiene lugar a partir del impulso nervioso, que proporciona la placa motora sobre la membrana de las células musculares, traduciendo en un acortamiento de las sarcómeras. La concepción molecular de la contracción muscular, propuesta por Szent-Györgyi (1941), parece ser la que mejor se ajusta a la realidad del fenómeno, al considerar que la asociación-disociación de las moléculas de actina y miosina, constituyen las dos etapas de la contracción. Cada parte de la célula muscular participa en el proceso con una responsabilidad característica (Tabla XI) (Baldwin y cols., 1982).

Esta contracción muscular solo tiene lugar cuando la señal que procede de un nervio motor se transmite al músculo esquelético. Un impulso nervioso que llega a la terminación nerviosa de la placa motora, produce a nivel de la hendidura sináptica la rotura de las vesículas de AcCo y la liberación de un mediador. La AcCo liberada, se fija sobre una proteína de la membrana postsináptica, produciendo una modificación en la configuración espacial, que induce un aumento de la permeabilidad iónica (Heistracher y Hunt, 1969). Este hecho origina la aparición de un "potencial de placa motora", que a partir de un nivel crítico de despolarización, genera un potencial de acción (Figura 29).

Una vez producida la despolarización, la AcCo liberada en respuesta al estímulo nervioso, es rápidamente inactivada por una enzima específica, la acetilcolinesterasa, cuya presencia a nivel del sarcolema está demostrada por técnicas histoenzimáticas (Nakajima y Endo, 1973).

El potencial de acción determina, a nivel del sarcolema en la unión neuromuscular, la formación de una onda de despolarización que se propaga por la membrana (Thomas, 1972). La excitación y los cambios iónicos que la acompañan, es conducida al interior de la célula, a lo largo de las membranas de los túbulos T transversos y

posteriormente transferida a las cisternas contiguas del RS en cuestión de milisegundos. Las proteínas de unión del retículo con los túbulos T, sensibles al incremento de potencial de acción, se activan y hacen que algunos canales de liberación de calcio localizados a este nivel, se abran y de esta manera el Ca^{2+} concentrado en el retículo se libera, provocando con su aumento de concentración la puesta en marcha del resto de canales de liberación del Ca^{2+} , multiplicando la acción (Meech y Standen, 1975; Lunde y Sejersted, 1997).

COMPONENTE CELULAR	LOCALIZACIÓN PRINCIPAL	FUNCIÓN PRINCIPAL
Sarcolema	Membrana celular	Propagación del potencial de acción
Túbulos transversos	Invaginación de la superficie celular en sitios concretos en relación con las miofibrillas	Conducción del potencial de acción al interior de la célula (cisterna terminal)
Cisternas terminales	Subsarcolémicas adyacentes a los túbulos T	Liberadoras de Ca^{2+} al iniciarse la contracción
Miosina	Filamento grueso de la banda A de la sarcómera	Cataliza la degradación de ATP; interacciona con la actina para producir fuerza y acortamiento
Actina	Filamento delgado de la banda I de la sarcómera	Interacciona con la miosina para producir fuerza y acortamiento
Tropomiosina	Situada en los surcos del filamento de actina	Bloquea los lugares activos de la actina impidiendo el contacto con la miosina
Troponina	En localización específica en el filamento de actina	Complejo de proteínas reguladoras. Se une a la actina y troponina. Fija Ca^{2+} y libera los lugares activos de la actina al desplazar la molécula de tropomiosina

Tabla XI.- Localización de los distintos componentes de la fibra muscular y su principal función. Modificada de Baldwin y cols., 1982.

La concentración de calcio liberado desde la cisterna terminal del RS hacia el citosol, varía desde un nivel latente de aproximadamente 10^{-7} M hasta 10^{-5} M (Endo, 1977), suficiente para saturar las moléculas de troponina C, alojadas en los filamentos de actina. El calcio transportado por la troponina, provoca una modificación en la

configuración de la molécula de tropomiosina-actina, que a su vez capacita a la actina para interactuar con la cabeza de las moléculas de miosina integradas en el filamento grueso. Este mecanismo lleva a un estado llamado Mg^{2+} -ATPasa activado (Bagshaw y cols., 1975). La interacción de la actina con la miosina, supone un gasto de energía por conversión del ATP en ADP+P_i, catalizado por la miosina-ATPasa, que se traduce en un proceso mecánico, originario de una fuerza que puede o no producir el acortamiento de la fibra muscular (Sartorelli y cols., 1966) (Figura 30).

Para explicar el acortamiento de la sarcómera que se produce durante el proceso de contracción muscular, que aparece en respuesta al estímulo nervioso y a la despolarización que hemos descrito, se han postulado múltiples teorías, siendo la del "deslizamiento de filamentos" de Huxley y Hanson (1954), la aceptada como válida y comprobada posteriormente, tanto desde el punto de vista morfológico como bioquímico. La observación con microscopía óptica, hizo ver que la longitud de la sarcómera sufre variaciones entre un 20 y un 50%, según el músculo esté contraído o relajado, determinando variaciones en la configuración de algunas bandas. La longitud de la banda A permanece constante, así como la distancia entre la estría Z y el borde de la estría H. La banda I y la estría H disminuyen, pudiendo llegar a la desaparición completa en el punto de máxima contracción (Figura 31). Como ya dijimos anteriormente la transmisión de la señal es casi instantánea y por tanto todas las miofibrillas se contraen simultáneamente.

Los mismos cambios se observaron al microscopio electrónico. Durante la contracción, los filamentos finos se deslizan entre los filamentos gruesos hasta la mitad de la sarcómera, tirando de la estría Z, a la que están unidos y provocando la disminución en longitud total de la sarcómera. En la relajación, el solapamiento de los filamentos se reduce.

Esta teoría implica la existencia de puentes de unión entre los filamentos, con disposición simétrica respecto a la línea M. Al microscopio electrónico se puede observar como los filamentos de miosina presentan pequeños brazos laterales que entran en contacto con los filamentos contiguos de actina. Estos puentes de unión corresponden a las cabezas de la miosina-II, y es en esta zona o dominio motor, donde se encuentra la actividad ATPasa (Mornet y cols., 1981). Cada molécula de actina de un filamento es capaz de unir una cabeza de miosina-II, formando un complejo que polariza estructuralmente el filamento de actina. Las cabezas de miosina están orientadas en direcciones opuestas a cada lado de la zona central desnuda de los filamentos de miosina-II. La imagen superpuesta de las proyecciones laterales de cada cabeza de miosina tiene una apariencia de punta flecha a lo largo de los filamentos de actina. Como las cabezas deben interactuar con la actina en la región de solapamiento, los filamentos de actina deben tener polaridades opuestas a cada lado de la sarcómera (Higashi-Fujime, 1986). Todas las puntas de flecha de la miosina apuntan en dirección

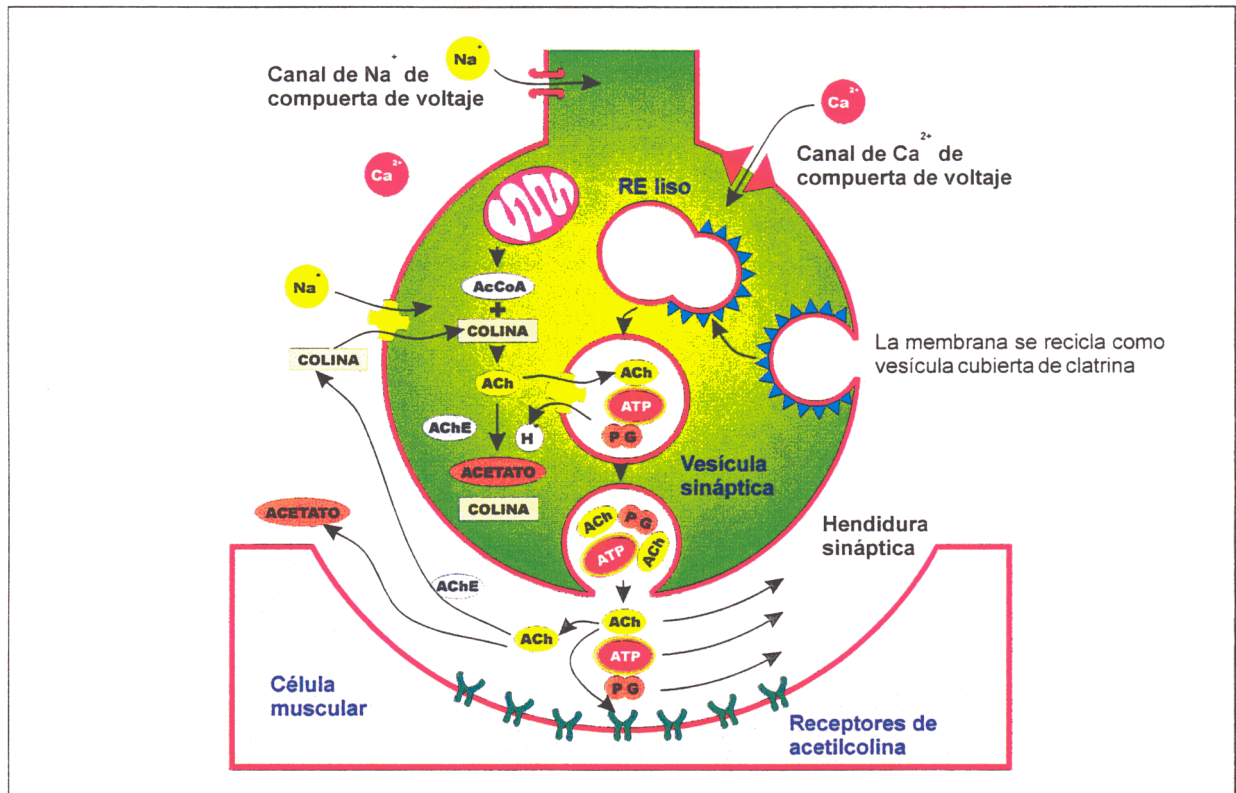


Figura 29.- Esquema de los procesos que tienen lugar a nivel de la unión neuromuscular durante la descarga de acetilcolina. Modificado de Katzung, 1989.

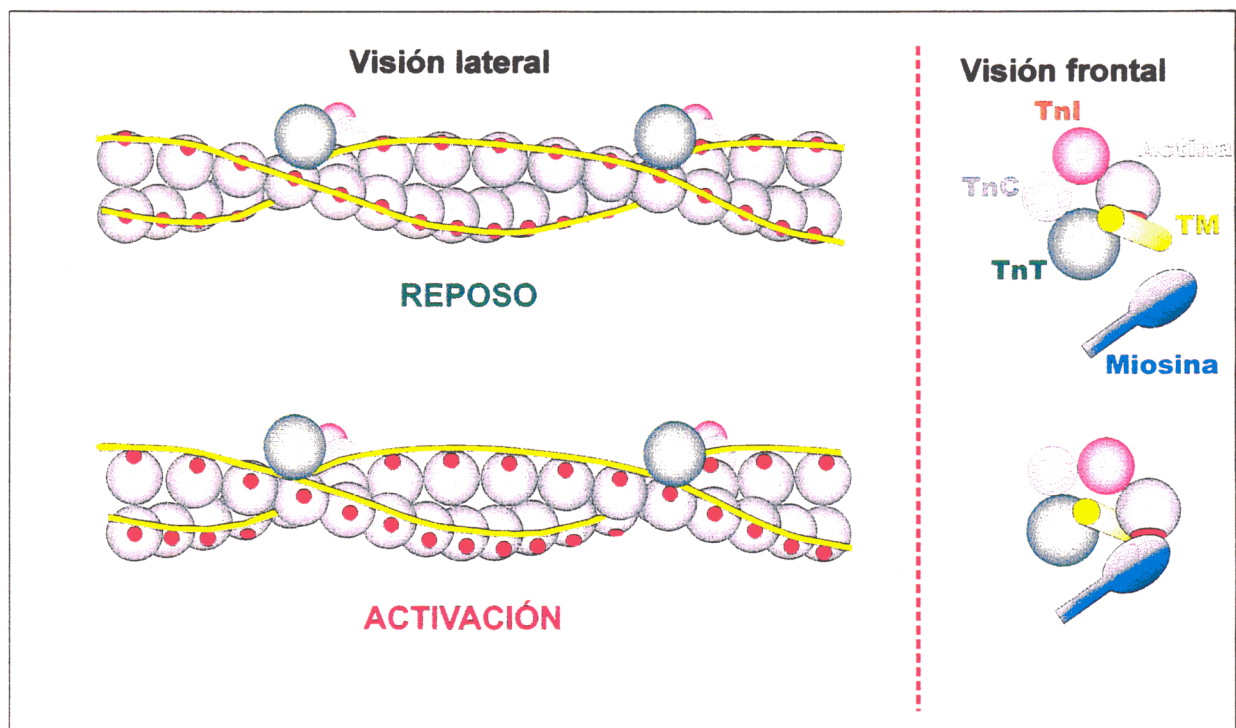


Figura 30.- Representación esquemática tridimensional del mecanismo de modificación en la configuración de la molécula de troponina-actina, que posibilita la interacción de la cabeza de miosina.

opuesta a las bandas Z. El extremo puntiagudo de esta configuración correspondería al extremo "menos" o de crecimiento lento, el extremo ancho correspondería al extremo "mas" o de crecimiento rápido. La unión de la molécula de actina con una cabeza de miosina-II forma un complejo de morfología regular y específica (Cooke, 1997).

El mecanismo bioquímico de la contracción sería el resultado de la hidrólisis del ATP y el camino de cada molécula de miosina en una única dirección a lo largo del filamento de actina adyacente. Este ciclo puede dividirse en cuatro fases (Hill y Hartree, 1920):

1º.- Fase de unión: Al principio del ciclo, una cabeza de miosina se une fuertemente a un filamento de actina, en una configuración de rigor. 2º.- Fase de liberación: Una molécula de ATP se une al surco de la parte mas alejada de la cabeza de actina, que libera el lugar de unión con la actina. Con esta disminución de afinidad, la cabeza está libre para desplazarse. 3º.- Fase de movimiento: La cabeza se cierra alrededor de la molécula de ATP, cambiando su morfología, provocando un desplazamiento de aproximadamente 5 nm., posteriormente se produce la hidrólisis del ATP en ADP y Pi (Lymn y Taylor, 1971). 4º.- Fase de generación de fuerza: La cabeza de miosina se fija mediante una unión débil a un nuevo lugar del filamento de actina, provocando la liberación de Pi y de esa manera se refuerza la unión provocando un golpe de potencia ya que la cabeza recupera su conformación original (Elliott y Offer, 1978). En este mismo momento se pierde el ADP y se inicia un nuevo ciclo en el cual encontramos a la cabeza de miosina íntimamente unida a la actina en configuración de rigor, pero desplazada en el filamento de la actina en relación con su posición al principio del ciclo (Bershitsky y cols., 1997). (Figura 32).

Este proceso no se lleva a cabo en todas las cabezas de miosina al mismo tiempo y por consiguiente las que están separadas del filamento de actina, sufren la acción de las otras que sí permanecen unidas y son arrastradas. Las 300 cabezas de cada filamento de miosina, en una contracción rápida realizan aproximadamente 5 ciclos por segundo (Thomas y cols., 1980) y de esta manera el deslizamiento de los filamentos de miosina sobre los de actina alcanzan velocidades superiores a los 15 $\mu\text{m}/\text{sg}$.

Al terminar la contracción, la alta concentración de Ca^{2+} citosólico y unido a la troponina C, es bombeado de nuevo al interior del RS mediante la acción de una ATPasa dependiente de Ca^{2+} , presente en la porción longitudinal del retículo. En este proceso, la molécula de ATP es usada para recuperar dos moléculas de calcio. Este restablecimiento de niveles originales dura unos 30 msg. y de esta manera se establece nuevamente la posición de relajación de las moléculas que integran el filamento de actina de las miofibrillas (Tsugorka y cols., 1995). El complejo Mg-ATP-miosina debe ser restaurado a partir de la resíntesis de ATP, con un proceso metabólico complejo que se realiza tanto en el citoplasma, como en la mitocondria (Chance y Williams, 1956).

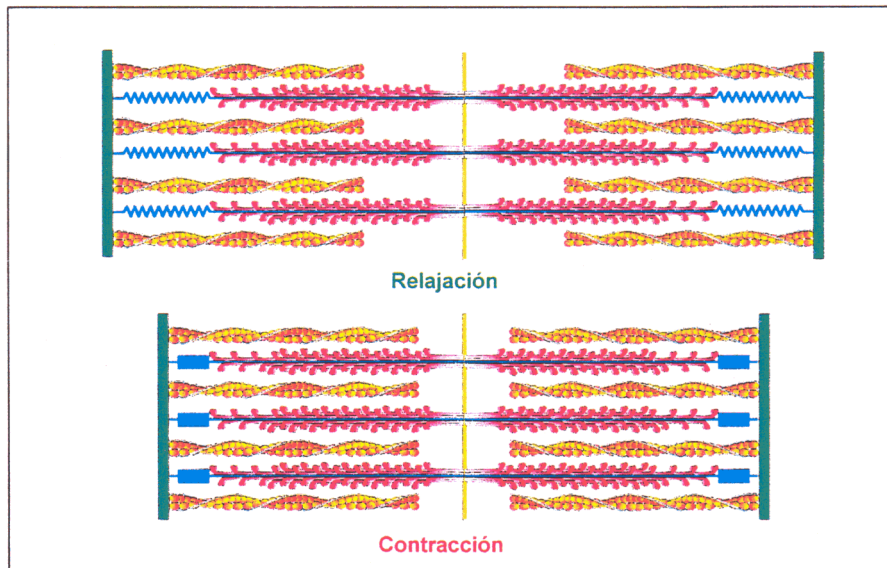


Figura 31.- Representación esquemática de los estados fundamentales de las sarcomeras durante el proceso mecánico de la contracción.

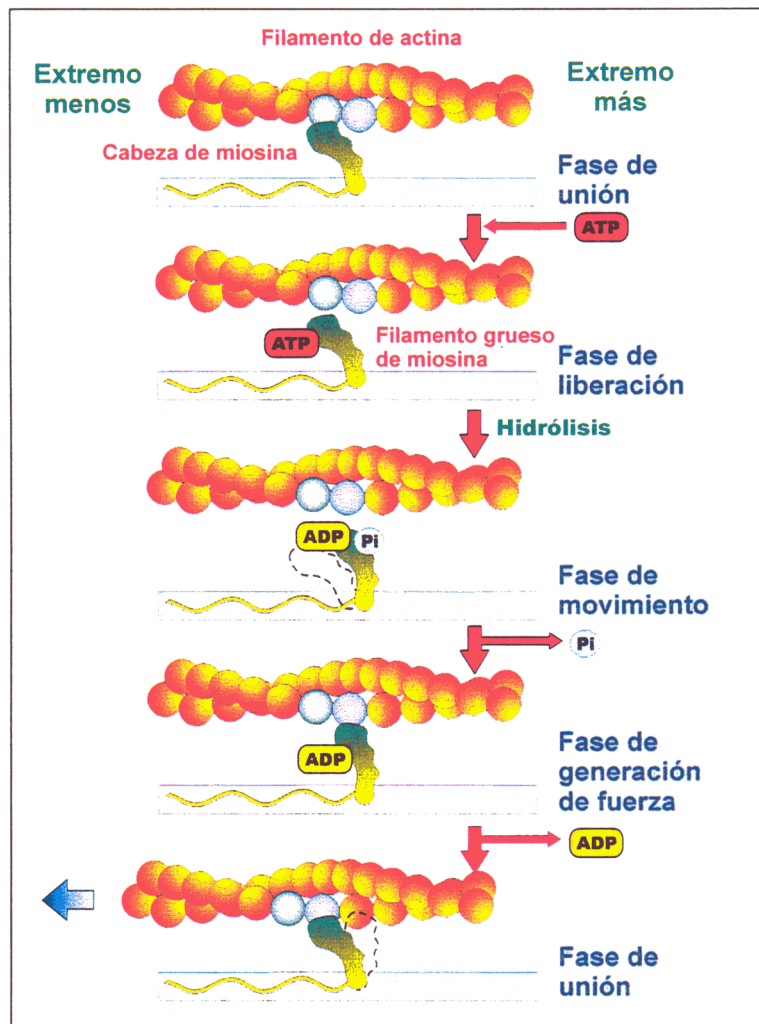


Figura 32.- Fases del mecanismo íntimo de la contracción, la miosina camina sobre la actina.

4.2.- PRODUCCIÓN DE ENERGÍA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

4.2.1.- Almacenamiento de alta energía.

La molécula principal de recambio energético en todo el ámbito de la biología, es el ATP. En el músculo esquelético se presenta solo pequeñas cantidades, de 5 a 7 $\mu\text{moles/gr.}$, por lo que constituye una reserva mínima para su utilización en la producción de fuerza y trabajo mecánico mantenido. Por ello, la célula muscular debe estar equipada con mecanismos enzimáticos que sean capaces de proporcionar continua y rápidamente nuevas moléculas de ATP para ser utilizadas durante la contracción.

Dentro de este primer eslabón de almacén de energía, podemos incluir compuestos de fosfato altamente energéticos, como la fosfocreatina, sobre la que actúan enzimas del tipo de la creatina fosfoquinasa, que cataliza la transformación de ADP en ATP por una sencilla reacción, y que se presenta en abundancia en las fibras musculares. Aun así, su concentración es limitada entre 15 y 20 $\mu\text{mol/gr.}$ y las reacciones químicas que involucran el metabolismo de este sustrato básico de reserva, no constituyen un seguro en el mantenimiento de la actividad (Shriver, 1986). Por tanto, hemos de pensar en un almacenamiento de sustratos que sean los que en periodos largos de actividad, van a mantener la contracción muscular.

4.2.2.- Almacenamiento de sustrato energético.

Las reacciones químicas que se originan en la célula muscular, para conseguir ATP suficiente para llevar a cabo su función, pueden tener lugar con o sin aporte continuo de oxígeno, de forma que existe una vía aerobia y otra vía anaerobia, con evidente diferencia en el rendimiento de cada una. Durante el movimiento, en el que participan diversos grupos de músculos que no trabajan al unísono y con tiempos variables, desde segundos a horas, la incorporación de O_2 al individuo es de importancia clave para conseguir energía al ser utilizado por las mitocondrias (Billeter y Hoppeler, 1994).

En la actualidad existe el acuerdo de que la circulación central limita la incorporación máxima de O_2 , existiendo una elevada correlación entre el máximo de O_2 necesario, el gasto cardíaco máximo y la concentración de O_2 en sangre arterial (Astrand, 1990). Evidentemente, el potencial de las mitocondrias para consumir O_2 , normalmente excede la capacidad de la circulación para proporcionarlo. Saltin y Rowell (1980) calculó que el potencial del músculo esquelético humano en términos de flujo sanguíneo es de 2,0 a 2,5 l/Kg/min en condiciones normales.

En el ejercicio prolongado, la disponibilidad de sustratos para el metabolismo de consumo de O_2 es otro factor a considerar. El sustrato primario inmediatamente utilizable en nuestro caso, es el glucógeno. El músculo esquelético humano puede almacenar una cantidad variable de glucógeno, entre 10 y 15 mgr/gr, dependiendo de la dieta y la actividad básica. Durante la contracción las enzimas reguladoras, fosforilasa y fosfofructoquinasa (PFK), son activadas para metabolizar el glucógeno a ácido pirúvico. Estas primeras transformaciones son rápidas, pero consiguen un bajo rendimiento de ATP, y es en los pasos siguientes del metabolismo de piruvatos en las mitocondrias donde se generan cantidades relativamente grandes de ATP, con producción de CO_2 y H_2O , propias del metabolismo oxidativo (Tabla XII). La capacidad de oxidación del piruvato es dependiente en primer lugar del número de mitocondrias presentes en cada tipo de fibra (McDougall y cols., 1979). En algunos casos, la capacidad para glucogenolisis es mucho mayor que la capacidad de las mitocondrias en metabolizar el piruvato, generalmente por falta de aporte de oxígeno. En estas condiciones el piruvato se convierte en lactato en el citoplasma y se lleva a cabo su metabolismo por vía anaerobia (Robinson y cols., 1994).

<i>I.- Reacción principal en la utilización del ATP</i>	
$ATP \xrightarrow[\text{Miosin-ATPasa}]{\text{RS-ATPasa}}$	$ADP + Pi \text{ (liberación de energía)}$
<i>II.- Síntesis de ATP por vía aeróbica</i>	
a.- $ADP + \text{Fosfocreatinina} \xrightarrow[\text{fosfoquinasa}]{\text{Creatinín}}$	$ATP + \text{Creatinina}$
b.- $2 \text{ ADP} \xrightarrow{\text{Mioquinasa}}$	$ATP + AMP$
c.- $\text{Glucógeno} + 3 \text{ ADP} \longrightarrow$	$2 \text{ Piruvato} + ATP$
<i>III.- Reacción principal mitocondrial en la síntesis de ATP</i>	
a.- $2 \text{ Piruvato} + 6 O_2 + 36 \text{ ADP} \longrightarrow$	$6 CO_2 + 6 H_2O + 36 \text{ ATP}$
b.- $\text{Palmitato} + 23 O_2 + 130 \text{ ADP} \longrightarrow$	$16 CO_2 + 16 H_2O + 130 \text{ ATP}$

Tabla XII.- Resumen del metabolismo estequiométrico de la síntesis y degradación de ATP en el músculo esquelético. Modificada de Baldwin y cols., 1982.

La mayoría de las fibras también utilizan glucosa exógena, que se provee por vía sanguínea supletoria. Sin embargo, en el músculo esquelético, el consumo de glucosa es relativamente bajo, en relación al glucógeno consumido, lo que lleva a tener muy en cuenta el estado del depósito de glucógeno cuando el músculo va a ser utilizado en un trabajo intenso, como pueden ser las pruebas deportivas (Viru, 1994). Esta regulación del metabolismo de los carbohidratos durante el ejercicio, será discutida en detalle en capítulos siguientes.

En un estado de baja concentración de este primer sustrato, el músculo esquelético también puede metabolizar ácidos grasos. Hay dos fuentes primarias de ácidos grasos relacionados con el músculo. La primera implica el almacenamiento de triglicéridos endógenos en la fibra muscular y la segunda, el de ácidos grasos y triglicéridos en el tejido adiposo. Estas fuentes dependen del transporte sanguíneo al músculo para su utilización. La movilización y oxidación de ácidos grasos es compleja y las reacciones implicadas tienen su base en la Tabla XII.

Los diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas, poseen distinta capacidad para utilizar ambas vías metabólicas, aeróbica o anaeróbica, desde el sustrato básico. El entrenamiento, en su sentido más amplio, proporciona a cada fibra una forma óptima, capacitándola, para el proceso metabólico oxidativo mantenido, con un mayor rendimiento de ATP por unidad de sustrato metabólico.

4.3.- PROPIEDADES FÍSICAS DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR.

Desde el primer momento hemos hablado de la función muscular como el resultado de la transformación de energía química en energía mecánica, es decir, en la realización de un trabajo, con todas sus características físicas conceptuales, modificadas por las características fisiológicas del organismo en el que se lleva a cabo el proceso (Huxley, 1988). De esta forma, se puede plantear su estudio desde diferentes puntos de vista, como puede ser el físico, fisiológico, médico, deportivo, psicológico etc., con un resultado muy complejo. A esta complejidad se une además la del elemento integrador, el sistema nervioso, aun más difícil de estudiar y controlar funcionalmente.

La riqueza de manifestaciones de la fuerza humana, es la consecuencia de tener en cuenta una serie de particularidades del músculo, en cuanto a su capacidad de desarrollar fuerza. En primer lugar, el rendimiento de la transformación de energía química en energía mecánica, que se cifra en un 20-30%; por otra parte, el proceso de contracción, que entraña la acción simultánea de muchas sarcómeras sincronizadas, en muchos músculos organizados, en acción conjunta entre protagonistas, agonistas y antagonistas. Tampoco se puede olvidar la disposición espacial de las células musculares, de sus vainas y cubiertas de tejido conjuntivo, de sus tendones y puntos de inserción. Con todo esto, se nos ofrece un vastísimo espectro de variaciones mecánicas, que tendríamos que considerar si el estudio se hiciese desde un punto de vista físico.

Nuestra valoración debe plantearse desde un punto de vista fisiológico, que nos permita relacionar las propiedades de la fuerza que desarrolla el músculo, con el trabajo realizado, y los fenómenos de contractilidad-velocidad, con el concepto de carga-velocidad, pero simplificando al máximo el análisis, para no olvidar el enfoque esencialmente morfoestructural del trabajo que nos ocupa.

4.3.1.- Propiedades mecánicas.

Por definición, una **fuerza** es la causa capaz de producir o modificar el estado de reposo o de movimiento de un cuerpo o de originar una deformación en él. En este concepto se aprecia una doble vertiente, por un lado dinámica, en cuanto a la capacidad de producir una aceleración en un cuerpo, y por otro estática, en cuanto a la capacidad de producir una deformación.

Desde el punto de vista fisiológico, la definición de fuerza puede considerarse como la tensión que un músculo puede oponer a una resistencia en un solo esfuerzo máximo. La fuerza muscular es absoluta, cuando medimos el valor máximo de la fuerza que puede desarrollar un músculo, en un movimiento dado, y es relativa cuando consideramos el cociente entre la fuerza muscular y el peso corporal del individuo. Dentro de este concepto general existen variaciones que contemplan aspectos o propiedades de esta fuerza: a) Fuerza máxima estática, es la mayor fuerza que el sistema neuromuscular puede ejercer voluntariamente, contra una resistencia imposible de vencer. Si la tensión que se origina es activa, las fuerzas externas actúan sobre el músculo en esfuerzo provocando una distensión. b) Fuerza máxima dinámica, es la mayor fuerza que el sistema neuromuscular puede realizar voluntariamente, durante el movimiento. Dependiendo de la velocidad a la que se vence la resistencia puede ser explosiva, rápida o lenta. Estas dos variantes de acción, que permiten desarrollar la fuerza máxima, llevaron a dividir todos los ejercicios en dos grandes grupos, ejercicios de fuerza-velocidad y ejercicios de fuerza-resistencia (López de Rego y Villalón, 1989).

El **trabajo** es otro concepto en relación con las propiedades mecánicas que estamos valorando que nos habla de un rendimiento, de una energía utilizada para que la fuerza produzca un desplazamiento. Y si además consideramos el trabajo en unidad de tiempo, estamos estudiando otra de las propiedades fisiológicas fundamentales en el músculo, como es la **potencia**. Es importante la inclusión del factor tiempo, porque la máxima potencia de músculo vendrá dada por la realización del mayor trabajo, en el menor tiempo posible. (Bershitsky y cols., 1997).

La potencia del músculo está referida por tanto, a la capacidad de generar fuerza (tensión), cuando se estimula para la contracción. En la longitud de reposo, el músculo es capaz de desarrollar una tensión máxima por unidad de material contráctil, que en el humano es de 3 a 4 Kgr/cm² de área de sección transversal (Roy y cols., 1982). Tanto la tensión que desarrolla el músculo cuando se contrae isométricamente (tensión total), como la tensión ejercida por el músculo no estimulado, varían con la longitud de la fibra muscular. La tensión activa es la diferencia entre estos dos valores, para una longitud dada (Huxley y Peachey, 1961).

La resistencia se refiere a la capacidad del músculo para mantener determinada cantidad de fuerza o repetirla en contracciones seguidas. Esta capacidad se relaciona con su efectividad en el mantenimiento de la energía para soportar el proceso mecánico de la contracción (Adrian y cols., 1969).

El último dato a tener en cuenta es la **elasticidad** del músculo, que es la capacidad para recuperar la forma original, una vez que ha sido sometido a una deformación. Esta propiedad puede hacer que actúen como acumuladores de fuerza al ser estirados por músculos antagonistas o fuerzas externas, capaces de liberar de nuevo esa energía, aumentando la fuerza al realizar la contracción. Esta elasticidad es imprescindible para garantizar el movimiento fino y continuo y es capaz de absorber la energía de traumatismos directos e indirectos para prevenir la aparición de lesiones (Takemori y cols., 1996).

4.3.2.- Tipos de contracción muscular.

Los diferentes resultados que se obtienen con la contracción de un músculo, están en función de que se produzca o no un desplazamiento de alguna parte del aparato locomotor. También pueden producirse contracciones diferentes y simultaneas, de forma que se realice un determinado trabajo y al mismo tiempo, se contrarreste el efecto de la gravedad sobre el cuerpo manteniendo la postura.

Cuando la contracción produce un acortamiento del músculo, se denomina **contracción anisométrica** (diferente medida). Se realiza contra una carga constante, con aproximación de los extremos del músculo, es decir, hay acortamiento y desplazamiento. Dependiendo de la cantidad de fibras que se contraen a lo largo de la línea articular, pueden ser a su vez **isodinámicos**, cuando el número de fibras musculares comprometidas permanece constante de principio a fin de movimiento, o bien **alodinámicos**, cuando el número de fibras contráctiles es mayor en el punto de la línea articular y menor en el resto de los ángulos articulares. Cuando el vector desplazamiento es del mismo sentido que la fuerza generada, se produce un trabajo positivo y la contracción se llama **concéntrica**, isotónica o dinámica, pero cuando el desplazamiento y la fuerza son vectores opuestos, por ejemplo, una fuerza externa frenada por el músculo, el trabajo es negativo y la contracción se llama **excéntrica**, el músculo se alarga mientras se desarrolla tensión. Dentro de este grupo también se considera la contracción **isocinética** o contracción a velocidad constante, con tensión máxima en todos los ángulos del movimiento (Gulati y Podolsky, 1981).

La **contracción isométrica** (igual medida) o estática, es aquella en la que el músculo desarrolla una tensión, pero no hay acortamiento ni desplazamiento, de forma que la longitud total del músculo no varía, debido a sus propiedades mecánicas y viscosas. El trabajo se produce en este caso por deformación, pero no hay trabajo

mecánico. Este tipo de contracción mantiene el tono postural contra la acción de la gravedad (Edman, 1979).

4.3.3.- Velocidad de contracción.

La velocidad de contracción se refiere al tiempo que tarda un músculo en desarrollar una fuerza. Esta velocidad varía en relación inversa a la carga. A una carga dada, la velocidad es máxima en la longitud de reposo y declina si el músculo está alargado o acortado.

La relación fuerza-velocidad se describe como la habilidad muscular para realizar una función o la fuerza que se genera durante una determinada contracción isotónica. Esta relación es hiperbólica para todos los tipos de fibras. Cuando la carga se incrementa, la velocidad de acortamiento disminuye y viceversa. Para cualquier tensión, los músculos de contracción rápida pueden generar mayor velocidad de acortamiento que los de contracción lenta. Cuando ambos tipos de músculos se contraen a la misma velocidad, los de contracción rápida generan una cantidad de fuerza relativamente mayor que los de contracción lenta. Estos factores son importantes al considerar el uso de los diferentes tipos de músculos, para ejercer actividades que requieren diferentes facultades (Spector y cols., 1980).

La longitud de un músculo dado y el mayor alineamiento paralelo de sus fibras, aumenta su capacidad de acortamiento. Esto ocurre principalmente, porque hay más sarcómeros dispuestas en serie, según la dirección del movimiento. La ruptura de las fibras musculares, se presenta cuando se estira tres veces por encima de la longitud de equilibrio (relajado y sin inserciones).

4.3.4.- Rendimiento de la contracción.

El rendimiento de la fuerza de un músculo, puede variar por dos vías: aumentando el número de estímulos, o reclutando nuevas unidades motoras (Hill, 1922). En el primer caso, se consigue un aumento de fuerza con el entrenamiento, que está relacionado con la habilidad de un músculo en mantener determinado rendimiento contráctil o de repetirlo en contracciones seguidas. Cualquier programa de acondicionamiento físico destinado a mejorar la función mecánica del músculo, debe considerarse atendiendo a las propiedades anteriormente expuestas (potencia y resistencia). La capacidad generada en el entrenamiento se expresa en términos de fuerza y velocidad de contracción (Baldwin y cols., 1982).

Refiriéndonos a un aumento de rendimiento por el reclutamiento de nuevas fibras, sabemos que para la mayoría de las actividades, no todas las fibras que componen un determinado músculo son estimuladas en cada contracción. La proporción de fibras

reclutadas, puede depender del grado de inervación, es decir, el número de neuronas que controlan las fibras, que son activadas por el sistema nervioso. El reclutamiento de unidades motoras, depende pues, del incremento del esfuerzo voluntario, y el gradiente de respuesta muscular, depende del número de motoneuronas activadas (Allinger y cols, 1996).

4.3.5.- Estímulo nervioso.

En cuanto a la respuesta eléctrica al estímulo nervioso, sabemos que el potencial de reposo de la membrana del músculo esquelético es aproximadamente de -90 mv. El potencial de acción dura de 2 a 4 mseg. y es conducido a lo largo de la célula muscular, a una velocidad aproximada de 30 m/seg. El periodo refractario absoluto, dura de 1 a 3 mseg. y las polarizaciones tardías, incluyendo los cambios de umbral para la estimulación eléctrica, son relativamente largos (Eisemberg y Kielley, 1972).

La cronaxia o tiempo de aplicación de una corriente de intensidad doble de la necesaria (reobase) para producir un estímulo, es un poco más elevada que la del nervio. Existen diferencias en los umbrales de excitación de diferentes tipos de fibras. El tamaño del potencial de acción registrado en un músculo total, es proporcional a la intensidad de la corriente estimulante entre la del umbral y las intensidades máximas de corriente.

El mecanismo contráctil no tiene periodo refractario y la estimulación repetida antes de que aparezca una relajación, provoca la activación adicional de los elementos contráctiles y por consiguiente una respuesta que se agrega a la contracción ya presente. La tensión desarrollada en este caso es considerablemente mayor. Cuando la repetición de estímulos no deja periodo de relajación de la fibra, se altera el proceso de secuestro y liberación de Ca^{2+} y miosín-ATPasa, conduciendo a una contracción tetánica, cuya tensión es cuatro veces mayor que la contracción simple (Baldwin y Winder, 1977 y Tsugorka y cols., 1995).

Para Spector y cols. (1980), los músculos de contracción rápida, pueden soportar una sacudida muscular (contracción-relajación para un solo potencial de acción) cada 7,5 mseg y alcanzan el tope de fuerza tetánica con frecuencias de estimulación altas, mientras que los músculos de contracción lenta, con sacudidas cada 100 mseg, llegan a alcanzar la tensión tetánica con frecuencias de estimulación baja. Sin embargo, el estudio "in vitro" de cada tipo de músculo lento o rápido en contracción, referido a la unidad de área transversal, da igual umbral de tensión tetánica (Baldwin y cols., 1982 y Ruff, 1996).

Todos estos factores afectan la respuesta de contracción independientemente de las propiedades bioquímicas que regulan los mecanismos contráctiles, pero los datos

morfoestructurales del músculo deben ser siempre considerados cuando se evalúa su papel funcional al preparar actividades variadas.

5.- VARIACIONES EN EL TEJIDO MUSCULAR ESTRIADO ESQUELÉTICO CON EL EJERCICIO.

Todos los datos aportados hasta el momento, nos hablan de la gran plasticidad de este tejido y de su alta capacidad de adaptación, según los requerimientos impuestos por las distintas actividades mecánicas a las que se ve sometido el organismo. En nuestro caso concreto, ante los diferentes entrenamientos que debe practicar un atleta, vemos cómo esta plasticidad puede traducirse ampliamente, desde los poderosos músculos de un levantador de pesas, hasta la alta resistencia a la fatiga de los músculos de un corredor de maratón. Estas diferencias vienen marcadas por los cambios durante el entrenamiento.

En la actualidad se considera que las variaciones que el músculo experimenta durante el ejercicio, forman parte de un proceso normal de crecimiento del tejido y del individuo, por tanto, los estudios sobre el modo en que se produce el incremento en las fibras musculares, quedan solapados por el estudio de un proceso normal del desarrollo.

5.1.- CRECIMIENTO DE LA FIBRA MUSCULAR.

Ya desde 1897, Morpurgo viene apuntando la hipertrofia de las fibras musculares como respuesta a un entrenamiento para el ejercicio, aunque él lo atribuía a un incremento total del sarcoplasma. A partir de estudios bioquímicos (Helander, 1961) y citológicos (Goldspink, 1964), vemos cómo el trabajo inductor de la hipertrofia, en nuestro caso el ejercicio, está asociado normalmente a un gran aumento del material miofibrilar de la célula, fabricado fisiológicamente, para conseguir mayor fuerza de contracción del músculo.

De todos es conocido que la capacidad del músculo para desarrollar fuerza por unidad de área es constante, y por tanto, la cantidad de fuerza muscular producida, depende directamente del tipo y número de sarcómeras en serie que aparecen en la fibra muscular, es decir, de las medidas en longitud y superficie transversal de las miofibrillas (Ikai y Fukunaga, 1970), imponiéndose la necesidad de conocer cómo se producen estos cambios durante el crecimiento y en relación al ejercicio.

El incremento fisiológico del tamaño de un músculo, en relación a su peso, aparece en los primeros estadios postnatales, viendo cómo el bíceps braquial, con un peso inicial de 20 gr, llega a conseguir 110-150 gr en el adulto (Fleay y cols., 1960). El peso total del músculo, utilizado por estos autores, como método simple para estimar los cambios de composición, les llevó a definir que el aumento absoluto del tamaño de

un músculo depende de su función y de su localización en el esqueleto. En planteamientos similares, Alway y cols (1989) comparan las variaciones de aumento de peso muscular en hombres y mujeres culturistas, con respecto a un grupo control sedentario, determinando que el aumento en el número de Kgr/masa corporal, es de un 35% mayor en el grupo masculino. Iwaoka y cols (1989) estudian la diferencia de peso muscular entre un grupo de atletas de edad avanzada, que han mantenido el entrenamiento durante toda su vida, viendo que presentan un peso muscular 58,2% mayor que el grupo control de la misma edad. Hortobagay y cols. (1993) apuntan la labilidad de este parámetro. al valorar el peso de atletas de diferentes deportes, que abandonan el entrenamiento, sólo durante 15 días, viendo que disminuye una media de 2,6% del peso inicial.

De este peso, el 85% corresponde a las fibras musculares y su aumento está confinado a alteraciones en el sistema miofibrilar, así como a cambios en las mitocondrias y RS, directamente implicados en la contracción muscular. El 15% restante corresponde a material extrafibrilar, implicado también en los cambios indicados (Kobayashi y Yonemura, 1967). Su composición varía, desde un 90% en agua en el músculo fetal, un 78,5% entre los 4 y 7 meses y un 76% en el adulto. El aumento de proteínas, que a las 14 semanas de nacimiento llegan a 2,8 veces y 3,5 veces en el adulto, está reflejado sobre todo en el incremento de la fracción fibrilar (Ling y Kromash, 1967).

La síntesis de proteínas fibrilares no se produce sólo durante el trabajo muscular. Carraro y cols. (1990) han planteado sus variaciones en el ejercicio aerobio, valorando la excreción en orina de la 3-metilhistidina y el nitrógeno total. Ellos determinaron que este tipo de ejercicio estimula la síntesis hasta 4 h después de terminar el entrenamiento, durante el periodo de recuperación. Recientemente, Neuffer y cols. (1996), con estimulación eléctrica continuada, han determinado un llamativo aumento de RNAr y RNAm para proteínas que intervienen en la adaptación de la mayor demanda metabólica muscular al ejercicio, hasta niveles de 50 veces más que en reposo, durante las 24 horas siguientes al inicio de la estimulación y con niveles de proteínas de hasta 10 veces su valor normal, hasta 21 días después de terminar la estimulación.

En la década de los 80, una serie de investigadores hicieron notar que en las primeras fases de estimulación muscular por entrenamiento deportivo, aparecen en el tejido muscular lesiones puntuales, que después de poco tiempo desaparecen, a la vez que empieza el periodo de crecimiento de las células musculares, ya sea por hipertrofia, como por hiperplasia. En esta línea, Malcon y cols. (1983), utilizando estimulación eléctrica sobre músculos de contracción rápida en el pollo, empiezan por mostrar cambios en el RS, incremento en la cantidad de enzimas oxidativas, cambios en la regulación de proteínas y finalmente, predominio de expresión de isoformas lentas de miosina, que poco a poco sustituyen a las originales. Estos mismos autores, apuntan la

posibilidad de un control citoplásmico adicional, para traslación de RNAm de MLC-3f. Posteriormente Studitsky y cols. (1985), siguieron un protocolo similar en cuádriceps femoral de rata, y concluyen que la destrucción inicial tiene lugar en las fibras rojas, manifestándose por alargamiento del sistema T y elementos del RS, matriz mitocondrial hinchada, destrucción de crestas, degeneración vacuolar de parte de las mitocondrias y destrucción de miofibrillas individuales. Posteriormente sufre una acumulación de mitocondrias bajo el plasmalema, en las que pueden verse divisiones, indicando ya una recuperación, transformación de células satélites en mioblastos y presencia de centriolos en las células endoteliales.

En la misma época, Seene y cols (1986) hablan ya de un cambio en la proporción los diferentes tipos de proteínas de distintos tipos de músculos de ratas sometidas a un ejercicio intenso, siguiendo un proceso de adaptación a la actividad funcional aumentada, con rápida redistribución de aminoácidos. Ellos detectan un aumento de la actividad autocatalítica y acumulación de proteasas alcalinas, asociadas a fracciones microfibrilares, a la vez que disminuye la síntesis de MHC y aumenta paralelamente la de MLC. También detectan un cambio de miosina más rápido en los músculos tónicos y plantean la alternancia de síntesis como una reacción compensatoria, para mantener las propiedades contráctiles del músculo durante el ejercicio.

En el músculo humano se estudiaron también estos cambios iniciales inducidos por el ejercicio, aceptando como los mejor planteados los realizados por Sjöström y cols. (1987), detectando una degeneración-regeneración de las fibras tipo II, patología neuromuscular y signos de daño en nervios periféricos tras el ejercicio excéntrico mantenido. Estos cambios no aparecen en todos los casos, sino solo cuando hay un cambio brusco de actividad, cuando el ejercicio se mantiene hasta la fatiga o cuando el entrenamiento es extremadamente intenso, apuntando que en todos los casos aparece un tejido conjuntivo más abundante y con algunas células propias de procesos inflamatorios en esta localización, que además imponen un compromiso importante al aporte sanguíneo, por compresión vascular.

5.1.1.- Crecimiento longitudinal de las miofibrillas.

Los primeros datos aportados en cuanto al crecimiento en longitud de la fibra muscular (Gordon y cols., 1966), demostraron que la fuerza que el músculo puede desarrollar, depende del grado de solapamiento de los filamentos finos y gruesos y, que esta longitud óptima de la sarcómera es aquella con la que se consigue la interacción máxima entre los puentes de los filamentos de miosina con la actina. Por tanto, el crecimiento en longitud nunca podría implicar un simple alargamiento de la sarcómera, sino un aumento en el número de ellas, manteniendo la longitud óptima para desarrollar la fuerza requerida. Este nuevo enfoque fue desarrollado por Goldspink (1968), indicando que el crecimiento longitudinal posterior de las miofibrillas, está asociado a un

incremento en el número de sarcómeras en serie. Posteriormente Williams y Goldspink (1971) lo confirmaron en diferentes especies de vertebrados, al contar el número de sarcómeras en las diferentes edades, para cada especie considerada.

Paralelamente Goldspink, Larson y Davies (1970) utilizando aminoácidos o adenosina marcados radiactivamente, determinaron por autorradiografía, que el punto en el que se produce el crecimiento de la miofibrilla por nueva adición de sarcómeras, es el final de la fibra, en la que aparecen nuevas bandas marcadas radiactivamente. Estos mismos autores muestran con microscopía electrónica, cómo en la región de la unión miotendinosa aparece una zona muy marcada de crecimiento, con un gran aumento de polisomas, que indican síntesis proteica citoplásmica, próximos a filamentos libres formados, que se van acoplando al extremo final de la miofibrilla.

Rosser y cols. (1995) estudian la expresión de las miosinas en los extremos puntiagudos de las fibras y ven cómo hay un significativo aumento de MHCneo en estas localizaciones, que no aparece en otras zonas de la célula y que según se va alejando del extremo, empiezan a detectarse la presencia de neurotransmisores de acetilcolina, paralelamente a la presencia de MHCadulto. También hay un aumento de la actividad mitótica en células satélites de los extremos de las fibras, y un aumento de captación de aminoácidos y síntesis de proteínas, durante las dos primeras semanas de entrenamiento para velocidad (Tamaki y cols. 1997).

Para estudiar cómo variaba este número de sarcómeras asociadas de nuevo, Tabary y cols. (1972), Tardieu y cols. (1977) y Williams y Goldspink (1978), utilizaron protocolos con animales inmovilizados, y así vieron que la disminución en el número de sarcómeras varía, dependiendo de que la inmovilización se produzca con el músculo en estiramiento o en acortamiento, con una disminución mayor para el segundo caso. Al retirar la inmovilización el número de sarcómeras volvía rápidamente a la normalidad, en un proceso completamente reversible.

Además de este crecimiento en longitud, Russell y cols (1992) proponen una remodelación constante que mantiene la integridad de la fibra. Por medio de isótopos radiactivos, marcadores inmunológicos e hibridación "in situ", ven como hay una distribución intermiofibrilar y no sarcomérica de moléculas de RNAm para miosinas, que mantiene los cambios de la reserva de monómeros de miosina. Recientemente Fowler y cols (1993) han aportado nuevos datos muy complejos sobre el control de la longitud de los filamentos finos por medio de una proteína, la tropomodulina, que en un principio estaba identificada en eritrocitos humanos y ellos han localizado en el músculo. Esta molécula fija dos de sus unidades a otras dos moléculas de tropomiosina terminal del filamento fino, en el extremo contrario a la línea Z, bloqueando o liberando el crecimiento en el extremo final.

5.1.2.- Crecimiento transversal de las miofibrillas.

Pero el músculo no solo crece en longitud, también la superficie de corte de cada uno aumenta con el ejercicio y está generalmente aceptado, que no lo hace a expensas del aumento en el número de células, que se mantiene constante tras completarse el desarrollo embrionario (McCallum, 1898; Rowe y Goldspink, 1969; Stickland y Goldspink, 1973; Rosser y cols, 1995), sino que es debido al aumento en el número de miofibrillas de cada célula. Este hecho lo había apuntado ya Heidenhein en 1913, aunque no pudo ser confirmado hasta la utilización del microscopio electrónico.

El examen histológico de cortes de músculo en los últimos de la vida fetal, no revelan ninguna actividad mitótica o de crecimiento en el número de fibras, Nygaard (1982) piensa que este incremento en el número de fibras, es el resultado del crecimiento longitudinal de éstas, que al interponerse unas entre otras, ofrecen un aspecto de mayor número en el corte transversal. Este mismo planteamiento es apoyado por Rosser y cols (1995), que valoran el tipo de miosina en función del área de corte, viendo que cuando el número de células aumenta aparentemente, las de diámetro más pequeño expresan miosinas jóvenes, con MHCneo, mientras que esta isoforma no aparece en las de mayor diámetro, con lo que concluyen que estas nuevas fibras delgadas, solo son los extremos en crecimiento de las ya existentes.

Ya hemos descrito en apartados anteriores (2.2.2. y 4.1) la disposición exacta de las miofibrillas dentro de la sarcómera, para que la contracción sea óptima. En el caso del ejercicio constante, los filamentos periféricos de actina, ejercen una fuerza oblicua durante la contracción, que tira del disco Z, donde todos se unen, produciendo un desajuste en el retículo, con cada acortamiento durante la contracción. Cuando esta fuerza oblicua desarrollada es constante y muy rápida, como la que se produce durante los entrenamientos, llegan a romperse los discos Z en algunos puntos. Si se produce en toda la longitud de la miofibrilla, se separan dando lugar a nuevos elementos.

Shear y Goldspink (1971), comprobaron que en las fibras de contracción rápida, las miofibrillas presentan lugares de ruptura en toda la longitud, mostrando un punteado continuo y discreto, mientras que en las fibras de contracción lenta, aparecen las miofibrillas bifurcadas, presumiblemente por roturas incompletas. Posteriormente, Gibala y cols. (1995) demostraron con microscopía electrónica, la presencia de células con miofibrillas interrumpidas, en biopsias obtenidas al inicio de programas de entrenamiento, tanto en deportistas de resistencia como de velocidad. Para Tamaki y cols. (1997), este aumento de miofibrillas, está siempre precedido de un daño tisular a este mismo nivel, con rupturas múltiples, dependiendo de la intensidad del ejercicio, que serían fundamentales para inducir la regeneración, con formación de nuevos elementos. Por otro lado, esta rotura transversal, expone nuevos lugares para polimerización de monómeros de actina y miosina, que permite completar el crecimiento de estas nuevas

miofibrillas, así como colaborar al desarrollo extensivo del RS, del sistema de túbulos T y el aumento del número de mitocondrias, lo que en conjunto favorece el metabolismo muscular y su incremento en superficie de corte transversal.

Durante el desarrollo postnatal, se pueden apreciar ejemplos palpables de este proceso en músculos como el bíceps braquial, recto abdominal y gastrocnemio estudiados por Aherne y cols. (1971) en 22 hombres, viendo como sus fibras aumentan desde $36,5\text{-}48,2\ \mu\text{m}^2$ a las 37 semanas, hasta $2.000\ \mu\text{m}^2$ a los 18 años. Estudios más amplios de Colling-Saltin (1980), aportan datos del desarrollo de la porción lateral del cuádriceps, rectos del abdomen, deltoides, bíceps braquial, soleo y gastrocnemio en 86 fetos y 50 niños de 7 años, con unas medidas de $36,3\ \mu\text{m}^2$ a las 12 semanas, $128\ \mu\text{m}^2$ a las 21 semanas, $200\ \mu\text{m}^2$ a las 42 semanas y $500\text{-}600\ \mu\text{m}^2$ al año. Brooke y Engel (1969) obtienen medidas en diferentes músculos del adulto, que oscilan entre 2.500 a $10.000\ \mu\text{m}^2$.

Sabemos que los cambios en el tipo de fibra y en la morfología del músculo, dependen de cuál va a ser su destino y su función. Este es un hecho comprobado por numerosos autores y entre ellos, Narici y cols. (1996), que demostraron cómo tras un programa experimental de entrenamiento asimétrico en ambas piernas, el incremento de área transversal en el cuádriceps, aumenta en un $18,8\pm 7,2\%$ en la región distal, un $19,3\pm 6,7\%$ en la proximal y un $13,0\pm 7,2\%$ en la zona media, mientras que en el vasto lateral, el aumento no es significativamente diferente en función de la localización.

Con el tipo de deporte varía el tipo de fibra que incrementa su superficie de corte. Mero y cols (1991) estudian grupos de niños de 11 a 13 años, a los que se somete a diferentes programas de entrenamiento para fuerza y resistencia, viendo que el aumento del área de las fibras es directamente proporcional a la edad y peso, a la cantidad de fuerza que son capaces de desarrollar para igual tiempo de entrenamiento, y a la concentración de testosterona y lactato sérico. El tiempo que llevan practicando el ejercicio, parece un elemento importante en las diferencias que se producen en el área de las fibras.

Datos referidos al desarrollo mediante el ejercicio, muestran cómo un levantador de pesas, generalmente presenta fibras con mayor superficie que un individuo sedentario o que aquellos que ejercen actividades sedentarias (Edström y Ekblom, 1972; Costill y cols., 1979). A las 8 semanas de entrenamiento, la masa total del músculo ha aumentado en un $2,5\%$ con predominio de las fibras de contracción rápida (FT) (McDougall y cols., 1979). La diferencia de la superficie transversa de las fibras entre hombres y mujeres dedicados al culturismo, fue estudiada por Alway y cols. (1989) viendo que el área media de corte fibrilar era de $9607\ \mu\text{m}^2$ en hombres y $5386\ \mu\text{m}^2$ en mujeres. Atendiendo al tipo de fibra, las tipo II eran 1,6 veces mayores en hombres que en mujeres, mientras que las tipo I presentaban una superficie similar. Bell y Jacobs

(1990) comparan el área fibrilar entre hombres y mujeres culturistas y con los grupos control respectivos. Para las fibras FTa, los culturistas tienen áreas mayores que los controles y los hombres bastante mayores que las mujeres. El análisis de ST muestra que en los culturistas tienen mayor superficie que en los controles. Entre el grupo de mujeres entrenadas, la superficie de ST y FT fue similar, pero entre los hombres FT era mayor que ST.

Las variaciones que aparecen en un grupo de hombres sanos con un programa de entrenamiento intensivo para velocidad, fue propuesto por Aitken y cols. (1989), viendo que la superficie de corte, todas sufren un incremento de $318 \pm 215 \mu\text{m}^2$ para las fibras tipo I, $625 \pm 207 \mu\text{m}^2$ las IIa y $773 \pm 196 \mu\text{m}^2$ las IIb.

Mientras tanto, en los atletas de resistencia, la hipertrofia fibrilar a los 6 meses es menor y con claro predominio de las fibras de contracción lenta (ST) (Gollnick y cols., 1972). Glenmark (1994) valora la diferencia de superficie de corte transversal y los tipos de fibras predominantes en deportistas de resistencia, hombres y mujeres, desde los 16 a los 27 años y demuestra que en ambos sexos aumentan en número las fibras tipo I, pero no en diámetro, con respecto al grupo control, pero es mayor en hombres en ambas edades.

En cuanto a la variación en el área de corte transversal de las fibras musculares en los atletas de resistencia aumentan en ambos tipos, pero durante los dos primeros meses lo hacen las fibras FT y entre los 2 y 6 meses el fenómeno aparece en ST. En sprinters masculinos, el área de las fibras FT era mayor que en el grupo control, pero en las mujeres no variaba (Abernethy y cols. 1990). En el entrenamiento intensivo para canoistas, Baker y Hardy (1989) observan que la superficie de las fibras tipo I no se altera significativamente, mientras que las tipo II aumentan hasta un 82% de la superficie desde el inicio del entrenamiento. Kuzon y cols. (1990) no encuentran diferencias significativas en el diámetro fibrilar entre futbolistas y controles, aunque todos los tipos tienden a ser algo mayores en los deportistas. Lo mismo sucede en los trabajos de Wang y cols (1993) y Andersen y cols (1994), que demuestran un ligero aumento en la superficie respecto a los grupos control, siendo además similar en todos los tipos de fibras.

Por otro lado, la inactividad durante 5 semanas provoca una disminución en el diámetro del 27% de las fibras ST y a las 15 semanas, la disminución de diámetros es del 47% para ST y del 38% para FT (Häggmark y Thorstensson, 1979) recuperando la normalidad al volver a realizar el ejercicio propuesto.

En el extremo opuesto, Iwaoka y cols. (1989) estudiaron la superficie de corte transversal en el músculo vasto lateral en campeones de salto, a los 71 años, en los que encuentra unas dimensiones de $34,3 \mu\text{m}^2$ en las fibras tipo I, $33,2 \mu\text{m}^2$ en las IIa y $23,4$

μm^2 para las IIb. A pesar de estas áreas pequeñas, se mantenían por encima de los sujetos con vida sedentaria y la cantidad de fuerza generada, estaba por encima de lo previsto para su tamaño. Lexell y cols (1995) plantean un estudio similar en mujeres y hombres de 70 a 77 años, que han mantenido un ejercicio de resistencia durante toda su vida, comprobando un significativo incremento de área en todos los tipos de fibras en el bíceps braquial, y más alto para las tipo II en el vasto lateral. Estudios similares fueron llevados a cabo por Taaffe y cols, (1997) y Sipila y cols, (1997).

5.1.3.- Variaciones en el retículo sarcoplásmico y sistema T.

El aumento de cisternas del RS y la extensión del sistema de túbulos T se presenta en paralelo al aumento de miofibrillas en cada célula. Ya vimos que la rotura en el espesor de las miofibrillas, a nivel de los discos Z, proporciona la posibilidad de independización de nuevos elementos miofibrilares, que crecen longitudinalmente por fijación de nuevas sarcómeras en serie, dando un aumento en el área de corte transversal de la célula (Shear y Goldspink, 1971). Alrededor de ellas se va extendiendo el RS, de forma que la velocidad de ceder o secuestrar Ca^{2+} se mantenga constante en todas las miofibrillas, tanto en estas fibras ST como en las FT (Shafiq y cols, 1981), aunque en las tipo I los túbulos T aparecen en menor cantidad que en las tipo II (Sato y cols., 1986).

Las proteínas del RS implicadas en el transporte de Ca^{2+} (Ca-ATPasa y Ca-secuestrina) van disminuyendo al avanzar la edad, pero en atletas que han mantenido su actividad a lo largo de toda su vida, esta disminución no se produce (Klitgaard y cols., 1989). También se sabe que la capacidad de acumular Ca^{2+} es de 4 a 11 veces mayor en las fibras FT que en las ST, aunque en éstas últimas existen otras proteínas fijadoras de calcio (Dulhunty y cols., 1987), por lo que no es un elemento diferenciador exacto. Maguire y cols. (1997) han estudiado cómo varía el proceso de oligomerización de la calsecuestrina en la fijación de Ca^{2+} , cuando se estimula el músculo con una corriente de baja frecuencia, sin observar cambios importantes en la función fijadora, al modificarse el tipo de fibras predominantes, de rápidas a lentas. Desde este punto de vista metabólico, Viru (1994) valora entre otros, la acumulación de Ca^{2+} y glucógeno en el RS, viendo cómo es mayor en los sprinters, seguidos de los corredores aerobios de medias distancias, los entrenados para fuerza y por último los nadadores.

Alway y cols (1989) analizaron la ultraestructura y las propiedades contráctiles en una población de levantadores de peso, antes y después de entrenamiento isométrico unilateral al 100% de contracción rápida. Para ellos, la densidad del volumen de la malla del RS y de los túbulos T en el músculo gastrocnemio, aumentan en un $3,2 \pm 0,6\%$ en las fibras tipo I y $5,9 \pm 0,9\%$ en el tipo II, después del entrenamiento. En el soleo, la fracción incrementada de volumen de RS llega hasta un $3,5 \pm 1,2\%$ en las fibras tipo I, sin embargo, la correlación no fue significativa entre el cambio en la densidad de

volumen del RS y el cambio en el tiempo de velocidad de contracción. La densidad del RS también ha sido estudiada por Sukhova y cols. (1991), comparando un grupo de sprinters con otro de atletas de deportes variados, en muestras obtenidas por biopsia del vasto lateral, viendo que el incremento es mucho mayor que en el caso de Alway y cols. (1989), con valores de un 28,5% en el primer grupo y un 36% en el segundo.

5.1.4.- Variaciones en la dotación mitocondrial.

Las variaciones en el número, tamaño y localización de las mitocondrias, según el tipo de fibra muscular, ya han sido descritas en el apartado 3.4.2. La relación volumen de las mitocondrias/volumen de las fibras, varía notablemente de un músculo a otro. En varias especies de animales, en los músculos utilizados para la locomoción, esta relación oscila entre un 2 y un 6%, mientras que en el diafragma alcanza del 10 al 12%. En el músculo esquelético humano de tipo mixto, como por ejemplo el vasto lateral, la relación volumen mitocondria /volumen de fibras, es de alrededor del 5% en sujetos no entrenados (Prampetro, 1990). Durante el entrenamiento para el ejercicio, se fuerza al músculo para aumentar su metabolismo, por tanto, los elementos citoplásmicos directamente implicados en él, como son las mitocondrias, sufrirán variaciones morfológicas y bioquímicas. El aumento del rendimiento de la fibra viene dado por la conjunción de ambos parámetros.

Los datos de que disponemos en la actualidad, son contradictorios en algunos puntos. McDougall y cols. (1979) plantean que la importante proliferación de las proteínas contráctiles que se instaura tras largo tiempo de práctica del deporte, da como resultado una dilución en la concentración de mitocondrias en la fibra muscular. Sin embargo, estas mitocondrias experimentan variaciones en su volumen como lo demuestran Jansson y Kaijser (1977) y Bylund-Fellenius (1977), para los que en condiciones físicas de entrenamiento regular, existe un incremento significativo del tamaño de las mitocondrias en las fibras FT, que llegan a ser 4 veces mayores que en el individuo sedentario, mientras que las mitocondrias de las fibras ST, sólo sobrepasan a éstos en 2,5 veces. Wang y cols (1993) estudiaron las variaciones del tamaño mitocondrial en el músculo vasto lateral, después de 18 semanas de entrenamiento para resistencia, encontrando un incremento del volumen mitocondrial absoluto con el entrenamiento, para la mayoría de los tipos de fibras, algo mayor en las de tipo I y IIa. Estos aumentos siempre eran proporcionales al del tamaño de la fibra.

Kayar y cols. (1986), plantean el mismo protocolo en atletismo, estudiando los cambios producidos por determinados ejercicios, no encontrando diferencias entre el tamaño de las mitocondrias de diversa localización dentro de cada fibra muscular, pero sí entre los atletas de resistencia, con un aumento en volumen y densidad de más del 50% con respecto al grupo control. Ingjer (1979 a y b), estudia las mismas variaciones en diferentes tipos de fibras en hombres y mujeres y en entrenamiento para resistencia.

El contenido mitocondrial fue determinado semicuantitativamente, utilizando el número de agregados subsarcolémicos presentes. El tamaño y acumulación de estas agrupaciones, variaba en gran extensión dentro de la fibra muscular, pero no describió diferencias con grupos control ni con entrenamiento para fuerza.

Estos datos pueden correlacionarse con los estudios de Hoppeler y cols. (1983 y 1985) en los que muestran cómo después del entrenamiento para resistencia, aparece en diferentes músculos de rata, un aumento de volumen y densidad mitocondrial, relativamente mayor en la zona subsarcolémica de la fibra, que en la interfibrilar. Sukhova y cols. (1991) determinan la densidad de volumen mitocondrial viendo que en sprinters aumenta en un 7,6% y en deportistas de resistencia de un 9,2%, en el vasto lateral. Howald y cols (1985) llevan a cabo un protocolo experimental de entrenamiento para resistencia en sujetos sedentarios, valorando resultados a las 6 semanas y a los 6 meses, demostrando cómo la densidad mitocondrial en cuanto a su volumen, aumenta en todos los tipos de fibras: a las 6 semanas las tipo I en un 35%, las IIa un 55% y las IIb un 52%, con distribución preferentemente interfibrilar para la primera y subsarcolémica en las dos segundas. A los 6 meses, la densidad del volumen mitocondrial sigue aumentando, pero en mayor proporción para las IIb, seguidas por las tipo I y IIa.

Morfológicamente, Ferretti y cols. (1997) estudian la densidad mitocondrial en muestras de biopsia del vasto lateral en deportistas, antes y después de 42 días de reposo total, y determinan que su densidad se ha reducido en un 16,6%. El volumen mitocondrial total también se ve afectado, con un descenso de 28,5% al final de la inmovilización.

La actividad mitocondrial se afecta en su totalidad y no sólo en lo referente al trabajo de sus enzimas, que veremos en el siguiente apartado. Recientemente Neuffer y cols (1996) han estudiado el momento en el que se desencadena la síntesis proteica para adaptación al ejercicio y de qué forma están compartimentalizadas las proteínas nacientes, en las etapas de inicio de la estimulación muscular con contracción continuada, valorando también en su protocolo, la expresión de proteínas que dependen de ADN mitocondrial y obtienen resultados de RNAm para las proteínas de shock térmico (HSP60) mitocondrial, con un incremento superior a más de 18 veces el primero y más de 5 veces para la proteína después de 21 días de ejercicio.

5.1.5.- Variaciones en la capacidad metabólica de la fibra muscular.

Las variaciones metabólicas con el ejercicio se plantearon a principios de los años 70, estudiándose en el hombre entrenado para resistencia y para desarrollar fuerza (Gollnick y cols., 1972). En ambos casos, se determinaron las variaciones en la capacidad para consumir O_2 , medidas por el nivel de actividad del ciclo del ácido cítrico y el sistema de transporte de electrones, viendo cómo la actividad de la citocromo

oxidasa y la SDH se encontraban elevados en los atletas de resistencia (McDougall y cols., 1979), mientras que el ejercicio destinado a desarrollar fuerza no alteraba la actividad de los enzimas mitocondriales (Costill y cols., 1979). Los estudios de Oscai y Holloszy (1971) muestran que otra parte de las enzimas mitocondriales no varían con el ejercicio, ni en su actividad ni en su concentración, como la CK, aldehído quinasa, α -GPDH, etc. Gollnick y su equipo continuaron avanzando en este planteamiento y demostraron que la adaptación más llamativa sigue siendo el incremento en la concentración de mitocondrias y de las enzimas para metabolismo oxidativo, durante el entrenamiento. Este incremento del potencial oxidativo aparece tanto en las fibras de alto consumo de O_2 (SO) como en las de bajo consumo (FG). El grado de adaptación del músculo, depende del tipo y duración del ejercicio. El cambio más llamativo es con el entrenamiento prolongado para resistencia y solo aparecen pequeñas variaciones con el enfrenamiento para velocidad. El incremento de potencial oxidativo aumenta su capacidad aerobia para utilizar su energía de reserva, en cuanto a depósitos intracelulares como aportados por vía sanguínea, tanto los dependientes de glucógeno, como el de ácidos grasos.

Sin embargo, al estudiar diferentes músculos de un mismo deportista (Gollnick y cols., 1972), habían visto que la respuesta adaptativa en la actividad enzimática tiene una naturaleza local. En ciclistas y corredores, la comparación de estos parámetros entre brazos y piernas, presenta niveles de actividad mucho mayor en las piernas, así como en los canoistas, la actividad enzimática de las mitocondrias de los músculos de las piernas, superaba ampliamente a la de los brazos.

Los sprinters y los deportistas entrenados para desarrollar fuerzas isométricas, fueron estudiados por Saltin y cols. (1976) y Baldwin y cols. (1973) respectivamente, llegando a la conclusión de que ambos grupos presentan una respuesta adaptativa, con un aumento significativo de enzimas mitocondriales, apoyando el hecho de que la concentración de estas enzimas aumenta en demanda a un alto consumo de O_2 por el músculo. Teniendo en cuenta el tipo de fibra muscular, con tinciones con NADH-nitrotetrazolium-reductasa o SDH, el aumento de enzimas oxidativos aparece en todas ellas. Aitken y cols. (1989) estudiaron la relación VCO_2/VO_2 después de un ejercicio incrementado al máximo, viendo que era mayor después del entrenamiento, sin variar VO_2 ni VO_{2max} .

Los estudios de Ingjer (1979a y b), iban también encaminados a caracterizar las fibras tipo IIab, concluyendo que el contenido mitocondrial y su capacidad metabólica, era intermedio para los valores obtenidos entre IIa y IIb, hecho que para Staron y cols. (1983) y Green y cols (1983), concuerda plenamente con la variación de la capacidad oxidativa de este tipo de fibras. Para Cogswell y cols (1993) las variaciones que aparecen en las enzimas mitocondriales, no dependen sólo del ejercicio, sino también de su localización en la célula, según sean intermiofibrilares o subsarcolémicas. Para

ellos, la citocromo oxidasa aumenta un 20% más en las intermiofibrilares y la SDH un 40% en las subsarcolémicas. Estas variaciones representan poblaciones mitocondriales en diferentes estadios biogénicos.

Wang y cols. (1993) en el mismo protocolo anteriormente comentado, obtienen un aumento de la citocromo oxidasa y hexoquinasa en todas las fibras, con el entrenamiento, pero la CK, citratosintetasa, PFK, gliceraldehido fosfato hidrogenasa y la hidroxiacetil CoA, no varían. El resultado sugiere que este tipo de entrenamiento para resistencia, produce un incremento en la capacidad de fosforilación oxidativa en conjunción con la disminución en el porcentaje de fibras tipo IIb.

Análogamente, durante el desentrenamiento o la inmovilización forzada, la caída de la actividad enzimática es mucho más rápida que la del máximo consumo de O_2 por ejemplo, después de casi cuatro semanas del final del entrenamiento, las enzimas mitocondriales han alcanzado los valores del periodo previo al entrenamiento, mientras que el máximo consumo de O_2 se mantiene todavía hasta un 12% más elevado que en individuos sedentarios (Prampero, 1990). Igualmente Ferretti y cols., (1997), tras 42 días de inmovilización, detectan un descenso en la capacidad oxidativa de un 11% en el vasto lateral de deportistas.

El crecimiento y diferenciación de las fibras musculares necesita la síntesis preferencial de proteínas miofibrilares, citoplásmicas o mitocondriales, que serán diferentes según el tipo de fibra considerado. Entre estos productos, Eriksson y Myrhaage (1972) estudió en adolescentes y Karlsson y cols. (1972) en adultos, el incremento de ATP y creatinín fosfato (CP) en los músculos de extremidades, con un programa de entrenamiento para resistencia. Después de 3 a 6 meses, la diferencia de concentración de ATP y CP era considerable respecto al grupo control. Según el tipo de fibra, su concentración es ligeramente mayor en la ST que en las FT, en los músculos de atletas masculinos de competición de resistencia (Härkönen y cols, 1980). Estos datos fueron ampliados por Tesch y cols. (1989) que estudiaron contenido de CP en el vasto lateral, antes, inmediatamente después y a los 60 minutos de terminar el ejercicio. Las concentraciones en reposo fueron de $82,7 \pm 11,2$ mmol/Kgr en las fibras FT y $73,1 \pm 9,5$ mmol/Kgr en las ST. Después del ejercicio los valores disminuyeron a $25,4 \pm 19,8$ y $29,7 \pm 14,4$ mmol/Kgr respectivamente para empezar a recuperar la concentración y llegar a los 60 minutos a $41,3 \pm 12,6$ y $49,6 \pm 11,7$ mmol/Kgr. En el mismo protocolo determinan que el ATP disminuye en todas las fibras y el lactato llega a $67,4 \pm 28,3$ mmol/Kgr después del ejercicio. La diferencia a favor de mayores concentraciones de CP en la fibras FT proporcionan un medio de valorar la diferencia metabólica (Bangsbo y cols. 1992).

Son poco conocidos los efectos del entrenamiento sobre la actividad de los enzimas glucolíticos en el hombre. Las reservas de glucógeno aumentan en hombres

entrenados para cualquier deporte, en comparación con el grupo control sedentario (Hermansen y cols., 1967; Gollnick y cols., 1972; McDougall y cols., 1979). El enfrenamiento para fuerza-velocidad no provoca ninguna variación significativa en las enzimas clave de la glicolisis. Sin embargo, cuando se reduce la intensidad del entrenamiento y se aumenta el tiempo, se observa un incremento de alrededor del 20% de la actividad de las fosforilasas y PFK (Green y cols. 1987; Prampero 1990).

Piehl y cols. (1974) y Saltin y cols., (1976) estudiaron la concentración de glucógeno en deportistas que entrenaban de manera asimétrica las extremidades contralaterales, resultando de sus estudios que esta concentración es de 6 a 60 mmol/Kgr de diferencia entre los músculos de la pierna entrenada con la no entrenada. En ciclistas, canoistas y nadadores, la diferencia entre brazos y piernas es de 20 a 101 mmol/Kgr mayores en brazos que en piernas.

El entrenamiento de resistencia conduce a un incremento del depósito intramuscular de glucógeno en todas las fibras, por aumento de la glucógeno sintetasa, mientras que el ejercicio de velocidad, incrementa el depósito de glucógeno de forma similar en cantidad, pero lo hace a expensas de reducir su utilización en el ejercicio moderado, consiguiendo que la deplección tarde más en producirse cuando el ejercicio es intenso (Abernethy y cols., 1990).

Essen y Henrikson (1974), determinaron una cantidad similar en el contenido de ambos tipos de fibras, ST y FT y en ambos disminuye después del ejercicio. El total de glucógeno utilizado en el ejercicio (hasta un 80-95% del depósito según Karlsson y cols., 1971), varía dependiendo del tipo de ejercicio, dinámico o isométrico, intermitente o constante (Gollnick y cols., 1972). Utilizando estimulación eléctrica, Sinacore y cols (1990) valoraron el grado de actividad de las fibras musculares, determinando la deplección de glucógeno. Todas las fibras dan reacción PAS+ de manera uniforme antes de la estimulación, pero después, la tinción disminuye mucho más en las fibras tipo II, llegando en algunos casos a la deplección de glucógeno casi total. Según Abernethy y cols. (1990), la deplección por ejercicio prolongado aparece en diferente orden de fibras, según el ejercicio realizado. En los deportes de resistencia, primero se elimina de las fibras ST para seguir las FTa y las FTb, mientras que en el ejercicio para velocidad o fuerza, la deplección aparece primero en FTb, FTa y por último en ST.

La actividad de la síntesis de glucógeno aumenta con el entrenamiento, así como la actividad de las enzimas implicadas, como la hexoquinasa, glucógeno sintetasa, etc. (Taylor y cols, 1972; Piehl y cols, 1974; Burke y cols., 1977 y Houston, 1978). Después del ejercicio prolongado, hay una resíntesis de glucógeno más lenta en las fibras tipo I que en las tipo II (Vilestad y cols., 1989). Las variaciones de los mecanismos glicolíticos han sido menos estudiados en cuanto al desarrollo durante el ejercicio de fuerza o resistencia y menos aun considerando las variables para cada área. En condiciones de

máximo esfuerzo, Landin y cols (1974) no han encontrado variación en la concentración y la actividad de PHOS, PFK y LDH, tanto en ejercicio dinámico como estático, pero sí parece estar en relación con la duración total del ejercicio. Al aumentar el tiempo de entrenamiento de 6 a 30 semanas, se observa un aumento del 10-20% en PHOS, hexoquinasa y PFK (Morgan y cols., 1971), manteniendo los niveles de LDH.

Las actividades de PHOS, PFK y PK no varían en el ejercicio en las fibras FT, mientras que en las ST tienen un 70% más de actividad para la PHOS y un 35% para la PK en el músculo soleo (Saubert y cols., 1973). Después de media hora de entrenamiento diario durante unos pocos días, el aumento de PFK es manifiesto en todas estas fibras, mientras que la inmovilización lo vuelve a valores normales (Illg y Pette, 1979; Viru, 1994). Para Santana-Pereira y cols. (1996) el contenido de PK fue menor en las fibras tipo I que en las tipo II, después de un periodo de entrenamiento para velocidad, mientras que Sahlin y cols (1997) con programas similares, apuntan que las fibras tipo II vacían antes que las I sus depósitos de glucógeno, en los límites de la fatiga.

La LDH es diferente en composición y localización celular dependiendo del tipo de fibra y puede ser un importante factor en la función fibrilar (Gollnick y cols., 1972; Karlsson y cols., 1974; Peter y cols., 1971). Así vemos cómo en los sprinters entrenados aparece LDH4-5 en mayor cantidad que en los deportistas de resistencia, en los que aparece una LDH1-2 (Sjodin, 1976). Esta molécula disminuye en soleo y porción blanca del gastrocnemio, después de 16 semanas de entrenamiento para resistencia.

Para Kiens y Lithell (1989) el entrenamiento lleva al organismo a una regulación y adaptación del metabolismo lipoprotéico. Ellos utilizaron un grupo de hombres sanos con entrenamiento para ejercicio dinámico en una pierna, utilizando la otra como control y tomando muestras de los músculos extensores. De sus resultados se desprende que la actividad de la lipoproteína-lipasa en ejercicio presenta concentraciones mayores que en reposo ($70 \pm 29\%$) y sus valores no vuelven a la normalidad hasta 2 h después de terminar el ejercicio. También el VLDL-triglicérido (VLDL-TG) aumenta desde 30 $\mu\text{mol/l}$ en el control, hasta 55 $\mu\text{mol/l}$ con el ejercicio. Estos dos parámetros elevados contribuyen a una alta producción de HDL colesterol (HDL2-C) con valores de concentración de 88 $\mu\text{mol/min}$, manteniéndose más alto a nivel venoso que arterial, durante el ejercicio. Puzo y cols. (1989) también encuentran valores significativamente más altos de ácidos grasos libres en el grupo control y en los deportistas de velocidad, en relación con los de resistencia que a su vez presentan un HDL-C más alto. Según Abernethy y cols. (1990) el entrenamiento para resistencia, incrementa los depósitos de triglicéridos próximos a las mitocondrias, en mayor cantidad en las fibras ST que en las FT. Los TG endógenos, pueden suponer hasta un 50% del total de lípidos oxidados durante el ejercicio.

La PGM disminuye en todos los músculos con la actividad, con cambios muy pequeños pero con significación estadística (Hickson y cols., 1975). En esta misma línea, Cannon y cols. (1989) estudiaron el aumento en sangre de la concentración de IL-1 β , después del ejercicio, viendo que se mantiene en músculo hasta después de 5 días. Esta inmunoreactividad no se ha visto en individuos sedentarios. La IL-1 α (TNF) se detecta en menor cantidad en las mismas condiciones, por lo que la inducción de proteólisis disminuye en los días siguientes al ejercicio.

Las variaciones en la concentración de iones, van unidas a las que soporta el glucógeno (Macchi, 1991), y así vemos que en el ejercicio prolongado, que además se acompaña de pérdida de electrolitos por el sudor, el K⁺ disminuye en mayor o menor proporción, paralelamente a la del glucógeno, mientras que el Mg²⁺ solo se ve afectado en escasa proporción (Ahlberg y cols., 1967). El Na⁺ intracelular aumenta en estas condiciones en respuesta a la acidosis (Bergström y cols., 1973). Sjogaard (1986) estudia estas variaciones y concluye que durante la contracción isométrica de baja intensidad, el flujo de sangre se mantiene relativamente alto, para aportar el suplemento de sustrato muscular (O₂ y glucosa) y prevenir la deplección del sustrato intramuscular. El mismo autor en 1988, en un trabajo orientado a prevenir la fatiga muscular, determina la disminución de K⁺ dependiendo de la intensidad de la contracción y la restauración a niveles normales, se consigue de 10 minutos a 1h después de terminar el ejercicio. Para este autor, el incremento de Na⁺ intracelular, es mínimo, compensado con los movimientos de agua intra y extracelular.

Una salida de K⁺ significativa desde el espacio intracelular, inducida por el ejercicio mantenido, puede llevar a una disminución de la contractilidad muscular, por disminución del potencial de membrana, pero el entrenamiento aumenta el número de bombas de Na-K en la membrana (Klitgaard y Clausen, 1989), para compensar que la disminución intracelular de K⁺ lleve a una acumulación de Ca²⁺ y disminución del ATP que llevarían a la destrucción de la célula. La concentración de bombas de Na-K fue determinada por Kjeldsen y cols. (1990) en el músculo vasto lateral, después del ejercicio moderado, viendo que apenas variaba (de 308 \pm 13 pmol/gr antes, a 300 \pm 7 pmol/gr después del ejercicio), pero con el ejercicio intenso e, número de bombas puede reducirse, variando la concentración de K⁺ plasmático (Sjogaard y McComas, 1995).

Los datos obtenidos por denervación, que aclararían qué tipo de control se ejerce sobre estas variaciones enzimáticas y metabólicas, son altamente contradictorios y son necesarias nuevas investigaciones para esclarecerlos.

5.2.- CRECIMIENTO DEL TEJIDO CONECTIVO MUSCULAR.

Son limitados los datos de que disponemos, en cuanto al estudio de las variaciones del tejido conjuntivo en el músculo sometido al ejercicio y sus diferencias,

si tenemos en cuenta el tipo y proporción de fibras musculares que componen cada músculo y el tipo de ejercicio a que se ve sometido. El incremento total en la cantidad de ADN en las fibras de atletas, afecta en gran parte al localizado en el tejido conjuntivo del músculo estriado esquelético (Fleckman y cols., 1978), por lo que habrá que considerar sus modificaciones al estudiar el aumento de tamaño del músculo con el ejercicio, sin olvidar incluir en este apartado las variaciones que sufre el árbol vascular que discurre por él.

5.2.1.- Variaciones en las vainas musculares.

Los primeros datos aportados en relación al aumento de tejido conjuntivo en el músculo, en relación al ejercicio, se los debemos a Häkkinen y cols. (1973), al estudiar el incremento de actividad de enzimas del metabolismo energético en el endomisio. Turto y cols. (1974) con inducción del trabajo en el músculo plantar de la rata y en el tendón del músculo gastrocnemio, consiguen valorar el incremento en la actividad de la enzima protocógeno-prolina-hidrolasa. En el entrenamiento para resistencia en ratones corredores, también se ha encontrado una estimulación de síntesis de tejido conectivo y tendones (Suominen y cols., 1980).

Teniendo en cuenta que la relación con los diferentes tipos de fibras puede variar el conectivo más próximo, Kovanen y cols (1980) detectaron un aumento de contenido de colágeno en las fibras ST en comparación con el colágeno de las FT que no varía. El estudio fue hecho en diferentes músculos de pollo y rata, con el entrenamiento para fuerza, induciendo hipertrofia.

En humanos, Suominen y cols. (1980) concluyen que tras 8 semanas de programa de entrenamiento, se incrementa la actividad de la propil-hidroxilasa en el conjuntivo del músculo vasto lateral de mujeres y detectan en hombres de 33 a 70 años, una alta actividad de la misma enzima en el mismo músculo, en aquellos que se han mantenido habitualmente activos, en comparación con los sedentarios.

El aumento en la proporción de colágeno, también fue detectado por Williams y cols. (1988) al estudiar el proceso de inmovilización. Este aumento se presenta pocos días después de la inmovilización y antes de que aparezca una disminución en el número de sarcómeros en serie. De esta manera confirman los datos anteriores de Williams y Goldspinck (1984), en los que este hecho solo se presentaba cuando el músculo era inmovilizado en posición de acortamiento. Esto mismo se puede constatar cuando disminuye el ejercicio de una pierna con respecto a la otra, pero no aumenta si la inmovilización se produce en extensión o cuando se combina con estimulación eléctrica.

Como vemos, son pocos los datos aportados y hacen falta nuevos estudios bioquímicos y morfológicos para determinar la diferencia del incremento que se produce con el ejercicio o en la inmovilización. En este sentido, Sakuma y cols., (1993) han estudiado morfológicamente las diferencias en la población de fibroblastos en ligamentos y fascias de músculos de ratas entrenadas para correr, viendo como en el grupo control, estas células presentan forma ovoidea y núcleo redondo, mientras que con el ejercicio los fibroblastos aparecen alargados y sus núcleos presentan escotaduras, además de aparecer un aumento en el retículo endoplásmico rugoso y en el número de vesículas lisosómicas. El diámetro de las fibras de colágeno varía entre 20 y 120 nm con el ejercicio, mientras que era de 50 a 80 nm en el grupo control. El diámetro medio de las fibrillas de colágeno fue de $70,8 \pm 16,6$ nm en reposo y $66,6 \pm 21,9$ nm con ejercicio.

5.2.2.- Variaciones en los capilares de la fibra muscular.

Sillau y Banchemo (1978) estudiaron el comportamiento de la vascularización muscular durante el crecimiento y desarrollo, viendo que cuando la fibra muscular aumenta en longitud y diámetro, también lo hace en valor absoluto, el número de capilares que la rodean, pero la densidad de capilares por unidad de área disminuye. Este aumento en el número de capilares por fibra varía según la especie y el músculo considerado. Hudlická (1980) determinó que los animales pequeños tienen una cantidad de capilares proporcionalmente mayor que las grandes especies.

Para Boreham y cols., (1988) hay una clara relación inversa entre el tamaño del músculo y la densidad capilar. Con la rápida reducción en esta densidad que impone el crecimiento, deben existir mecanismos compensatorios que mantengan una adecuada difusión celular. La mayor o menor superficie transversa de la fibra, puede aumentar o disminuir la distancia de difusión al centro de la célula, pero su concentración en pigmentos respiratorios contribuye a mantener el transporte adecuado de O_2 dentro de la célula (Aquin y cols., 1980).

Las marcadas diferencias en los índices de capilaridad entre el músculo rápido EDL y el sóleo lento, desaparecen cuando estos índices se relacionan con el tamaño de la fibra muscular, igual que sucede en la correlación entre la capacidad oxidativa del músculo y su capilaridad (Hoppeler y cols., 1983). En músculos no entrenados, las fibras FTb tienen una gran área de fibra por capilar y una baja capacidad oxidativa, pero la adaptación al desarrollo de fuerza que produce el uso de estas fibras, lleva a un aumento en el número de capilares, aunque la relación se mantiene constante. Los capilares empiezan a desarrollarse antes de que se detecten variaciones en los enzimas oxidativos (Boreham y cols., 1988). Por otra parte, pueden formarse nuevos capilares para mantener la relación capilar/fibra constante. Esta angiogénesis puede iniciarse por señales químicas debidas a la acumulación intracelular de metabolitos, asociados a la

hipoxia en el aumento de actividad durante el ejercicio, o resultar de factores mecánicos dependientes del flujo sanguíneo intracapilar (Hudlickä, 1984; Fuglevand y Segal, 1997).

Mizumo y Secher (1989) han comparado la vascularización entre los músculos respiratorios y el vasto lateral, en biopsias de hombres sanos sedentarios, determinando que el número de capilares/fibra fue más alto en espiradores internos ($2,3 \pm 0,1$), que en inspiradores internos y externos ($1,6 \pm 0,1$) y que en vasto lateral ($1,8 \pm 0,2$). Es decir, las fibras FTa que predominan en el primer músculo estudiado, presentan mayor capilaridad, dependiendo más de su trabajo que de su anatomía.

El planteamiento en atletas fue llevado a cabo por varios autores (Jennekens y cols., 1971; Andersen y Henriksson, 1977; Ingjer, 1978; Nygaard, 1982), utilizando técnicas de histoquímica y microscopía electrónica, en músculos humanos sedentarios y adaptados al ejercicio. Detectaron igualmente un incremento en el número de capilares por fibra y una disminución en el número de capilares por mm^2 . Este aumento de capilaridad en los músculos entrenados, va paralelo al aumento en la capacidad máxima del volumen de oxígeno, hecho en el que insisten Poole y Mathieu (1996), que mantienen que la superficie capilar por superficie de fibra puede estar en relación con las variaciones del volumen mitocondrial.

Bell y Jacobs (1990) estudiaron en culturistas de elite de ambos sexos, el incremento capilar viendo que es aproximadamente el mismo. El número de capilares/fibra en los deportistas fue mayor que en el grupo control, pero el número de capilares/ mm^2 era similar en todos los grupos.

En nadadores entrenados para resistencia, la media del área de fibra muscular, fue disminuyendo en la mayoría de los músculos entrenados (Nygaard, 1982) y en los corredores de maratón, sucede un hecho similar, manteniendo la proporción de capilares en las fibras ST. Kuzon y cols. (1990) en 11 jóvenes futbolistas de élite, comparados con un grupo control, en muestras de vasto lateral, determinan que el número de capilares es claramente mayor en los futbolistas. El número de los que rodean cada fibra, varía de $4,9 \pm 0,4$ en el control a $5,7 \pm 0,9$ en los deportistas y la densidad capilar de $220,8 \pm 38$ a $282,7 \pm 42$ respectivamente. Todo ello hace que la relación capilar/fibra también aumente de $1,7 \pm 0,1$ a $2,2 \pm 0,6$. Sin embargo, Wang y cols. (1993) no encuentran diferencia en la densidad capilar y en el número de capilares/fibra, estudiando biopsias del mismo músculo, antes y después de un periodo de 18 semanas de entrenamiento para resistencia.

Hepple y cols. (1997) con biopsias de vasto lateral en atletas de resistencia y velocidad de 65 a 74 años, concluyen que el número de capilares por perímetros de fibra, está aumentado en ambos grupos de deportistas, mientras que la densidad capilar aumenta solo en el entrenamiento aerobio de los velocistas.

En la inmovilización, el número de capilares por fibra disminuye, sin que aparezca todavía una disminución en el tamaño de la fibra (Saltin y Rowell, 1980), pero la inanición no parece que influya en la cantidad de capilares.

5.3.- CAPACITACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS SATÉLITES.

El papel atribuido por Moss y Leblond (1971) a la población de células satélites, como reserva de células para el mantenimiento, crecimiento y reparación del tejido muscular, nos lleva a tener en cuenta sus variaciones durante el crecimiento impuesto o no por el ejercicio.

Hay estudios sobre la dotación del ADN contenido en el músculo esquelético durante el crecimiento normal y en el entrenamiento deportivo (Hamosh y cols., 1967; Hubbard y cols., 1985), que podría interpretarse como un indicio de adición de nuevas fibras. Parte de este incremento de ADN está asociado a la proliferación de las células satélites del músculo que son incorporadas a las fibras preexistentes (Moss y Leblond, 1970), mecanismo que se ha propuesto ya como una forma de mantener constante la proporción núcleo/citoplasma, cuando este último aumenta por la hipertrofia (Shafiq y cols., 1968; Schiaffino y cols., 1976; Schmalbruch, 1978).

En este aumento de DNA, no debemos olvidar que también está implicado en el tejido conectivo que rodea la fibra muscular (Armstrong y cols., 1974), además de haber observado que al bloquear la síntesis del DNA, no se impide la hipertrofia de la fibra, como demuestra Fleckman y cols. (1978) en el soleo de la rata.

Sabemos que los núcleos que aparecen como nuevos en la célula muscular, no se sintetizan dentro de ella, sino que proceden de la proliferación de células satélites adyacentes. Bischoff (1986) demostró al estudiar cultivos de células satélites, en contacto con células musculares maduras y estimulando con mitógenos, que estas células, que en el adulto se mantienen en fase G0-G1 del ciclo celular, son capaces de activarse, multiplicarse y diferenciarse en mioblastos, para fusionarse en células multinucleadas parecidas a los miotubos, con posibilidad de unirse a la célula muscular.

Este proceso está influenciado por factores de crecimiento que están siendo estudiados en la actualidad. McLennan y Koishi (1997), estudiando músculos lesionados en los que se produce una invasión de células hematopoyéticas durante el proceso de reparación de la necrosis, llaman la atención sobre la falta de fusión de células satélites, mientras existe en el microambiente el factor de crecimiento y transformación $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$). Cuando las células hematopoyéticas desaparecen de la zona, después de reparado el tejido conjuntivo, empieza a aumentar el TGF- $\beta 2$, que parece estimular la formación de miotubos in vivo, a partir de las células satélites locales activadas. Con otro protocolo para ver el efecto de la radiación en el músculo esquelético, Phelan y Gonyea (1997)

ponen de manifiesto el papel activador para células satélites, del factor de crecimiento insulina-like, producido por los miocitos.

La velocidad de proliferación y la tasa de fusión son compatibles con la hipótesis según la cual, las células satélites fijan todos sus núcleos pegados a la fibra en crecimiento y confirman la observación de Kelly (1978), que detectaba un aumento de núcleos marcados con H3-timidina, en la zona de crecimiento del tejido muscular, primero en las células satélites y luego en las fibras. Recientemente, Robertson y cols. (1992) han demostrado por primera vez que, la diferenciación de células miogénicas, localizadas geográficamente entre el plasmalema y la lámina externa de los miocitos, en posición de células satélites, pueden fusionarse directamente con segmentos íntegros de plasmalema de miocitos maduros. Esta población celular, continúa presente durante toda la vida del individuo (Campion y cols., 1982), pero varía en número durante el crecimiento, como vemos por los protocolos de diferentes autores (Enesco y Puddy, 1964; Rowe y Goldspink, 1969; Ontell y Dunn, 1978), que además nos hablan de una gran diferencia entre especies y tipos de músculos.

Aloisi y cols. (1973) fueron los primeros en publicar que la frecuencia de las células satélites en músculos lentos como el soleo, es 3 veces más alta que en los músculos rápidos como el EDL. Schmalbruch y Hellhammer (1977) lo confirmaron y Kelly (1978) lo estudió en músculos en crecimiento. Este último autor determinó que el 5% de los núcleos situados bajo la membrana basal en el soleo de la rata adulta, corresponde a células satélites, mientras que en el EDL sólo llegan al 0,4%. Por denervación, el porcentaje medio para el soleo aumenta desde 4,1 a 8,5% y en el EDL desde un 1,2 a un 4,1% (Snow, 1983).

Las experiencias de Schultz (1984) de trasplantes cruzados de soleo en EDL, demuestran que el porcentaje de células satélites de cada tipo metabólico, está perfectamente conservado después del trasplante, mientras que en el trasplante inverso, de EDL a soleo, el músculo regenerado presenta un porcentaje más elevado de células satélites, característico del músculo lento (Schultz y cols., 1988).

En biopsias del músculo vasto lateral externo en atletas escaladores, después de la exposición a grandes alturas, se observa un aumento en el número de células satélites y mionúcleos del 215% (Martinelli y cols., 1990).

La regulación de estas variaciones parece que se opera por el número de divisiones mitóticas proliferativas, asimétricas y cuantales, posiblemente bajo el control del sistema nervioso, que precisan una investigación más amplia. Siguiendo esta línea, Kameda y cols. (1993) han demostrado que las células satélites de músculo de rata en cultivo, son en su mayoría inmunonegativas para MoAb marcadores de diferentes tipos

de fibras, pero si se añaden fragmentos de nervio raquídeo al cultivo, se forman los primeros miotubos a partir de ellas, que ya sí responden a los diferentes marcadores.

Esser y cols. (1993), han estudiado las isoformas de proteínas miofibrilares expresadas por estas células en los procesos de regeneración y han visto que son similares a los que expresan los mioblastos de segunda generación, MHCemb y MHCneo, pero no MHC β /s, que aparece en estadios posteriores, cuando ya hay fusión entre ellas o con un miocito.

5.4.- CAMBIOS EN EL CONTROL NERVIOSO DE LA UNIDAD MOTORA.

Las observaciones de Eccles y cols. (1962) sobre la inervación muscular, les llevaron a observar que las propiedades contráctiles del músculo, están asociadas con las frecuencias características de los impulsos que recibe. Por ello, el tipo de entrenamiento que desarrolla un atleta, va a variar tanto la cantidad como la intensidad de los estímulos que reciba el músculo, para un determinado trabajo. La forma en que estos mecanismos tienen lugar, continúa siendo objeto de numerosos estudios.

Sabemos ya desde los trabajos de Tello (1917) que durante el desarrollo prenatal y postnatal inmediato, todos los músculos presentan una poliinervación extensa, y Dennis y cols., (1981) determinan que en estos estadios del desarrollo, cada fibra muscular recibe estímulos desde diferentes motoneuronas. Esta poliinervación tiene un especial interés en el complicado mecanismo de control neuronal, durante la diferenciación del tipo de fibras (Gordon y van Essen, 1985), que según vimos en las aportaciones de Porter y Baker (1992), se produce paralelamente en la unión neuromuscular.

Se ha cuestionado con frecuencia si la conversión de las propiedades del tipo de fibras del músculo, de ST a FT o viceversa, dependería exclusivamente de la frecuencia de estimulación o de una sustancia neurotrófica segregada por el nervio y por tanto independiente de la frecuencia del impulso. Lowry y cols. (1980) encontraron que la estimulación directa puede jugar un papel regulador en las propiedades contráctiles del músculo y en última instancia el nervio motor es dominante, pero Eldrige y Mommaerts (1980), con otro protocolo experimental, demostraron que el determinante primario de estas propiedades contráctiles de la fibra muscular era tanto la actividad eléctrica como los factores neurotróficos. Cuando el nervio está intacto, pero eléctricamente silencioso, como ocurre en la sección traumática de la médula espinal, hay un cambio en la proporción de fibras musculares, pasando del predominio ST al de FT en el músculo, por tanto, para mantener las propiedades de contracción lenta, el nervio debe permanecer activo. También sabemos por los trabajos de Bernardi y cols. (1997), que un músculo puede reclutar estratégicamente, unidades motoras, dependien-

do del tipo de trabajo al que es sometido, afectando tanto a los agonistas como a los antagonistas.

Los procesos de reinervación de un músculo previamente denervado, deben hacerse a partir de motoneuronas que normalmente inervan fibras con las mismas características de contracción. Si se hace invirtiendo el tipo de inervación, también cambian las propiedades musculares, hacia las que determina la nueva inervación (Barany y Close, 1971; Close, 1972; Hoh, 1975 y Kelly y Rubinstein, 1980; Chammas y cols 1995). Para Oda (1985) hay una correlación directa entre el tamaño de la placa motora y el diámetro de la fibra en cada grupo muscular.

Estos datos fueron confirmados y ampliados por Zajac (1989) que estudió las señales de control neural en las transformaciones del músculo esquelético, analizando parámetros específicos, durante la excitación-contracción en la generación de fuerza. La estimulación continua de un nervio, lleva a la formación de placas motoras ectópicas. Estas placas son de menor tamaño que las preexistentes y muestran signos de transformación de rápidas a lentas. Parece que los tipos de placas son controlados por la influencia integrada de todos los impulsos axonales (Lomo y Waerhaug, 1985).

El uso sistemático de diferentes unidades motoras, o grupos de fibras musculares inervadas por una misma fibra nerviosa, en respuesta a distintas demandas fisiológicas, depende de la existencia de un procedimiento ordenado para su reclutamiento por el sistema nervioso central. El mecanismo está basado en la existencia de motoneuronas de diferente tamaño, umbral de activación y velocidad de conducción. Estas propiedades de los nervios fueron identificadas por Hursh (1939) y Rushton (1951). Su importancia en el control de reclutamiento motor fue elaborada por Henneman y Olson (1965). Las fibras de tipo ST están inervadas por nervios pequeños de bajo umbral y conducción lenta. Son motoneuronas de descarga tónica y baja frecuencia. Las fibras FT en cambio dependen de nervios grandes, de alto umbral y rápida conducción, procedentes de motoneuronas de impulsos crónicos y frecuencia alta variable (Sieck y Prakash, 1997).

Con el entrenamiento, el tiempo para producir una fuerza determinada se reduce considerablemente (Hakkinen y cols., 1990) desde 161 ± 107 ms a 93 ± 65 ms para 500 Nw. En atletas femeninos, el entrenamiento juega un papel importante en la adaptación a un trabajo inducido en el sistema nervioso para desarrollar fuerza muscular.

La necesidad de conseguir un mapa de distribución de unidades motoras, ha sido planteada por autores como McComas y Thomas (1968), McComas y cols. (1971), y Garnett y cols. (1978), quienes por medio de estudios electrofisiológicos, llegaron a la conclusión de que guardaban similitudes con otras especies. De sus estudios se deduce que todas las fibras inervadas por un mismo tipo de placa motora son homogéneas,

como lo prueban su composición histoquímica y sus propiedades metabólicas, reflejadas en el tipo de contracción (Kugelberg y Lindergren, 1979).

Por otro lado, se comprobó que las fibras innervadas por una misma fibra nerviosa, raramente aparecen próximas unas a otras, estando distribuidas en una amplia superficie de corte (Eisen y cols., 1974). Para la especie humana, Buchthal y cols. (1974) llegaron a determinar puede haber de 15 a 30 unidades motoras contenidas en 5 - 10 mm² de superficie muscular, pero el número de fibras por unidad motora varía de unos músculos a otros, así vemos como es aproximadamente de 110 en el músculo lumbricalis y de 1.720 para el gastrocnemio medio (McComas y cols., 1971).

Recientemente McMillan y Hannan (1991), determinaron el territorio de la unidad motora en el músculo masetero humano con métodos electrofísicos, y vieron que tienen una extensión de $8,8 \pm 3,4$ mm, con orientación preferentemente anteroposterior, siguiendo el eje mayor de la célula, dividiendo a ésta en compartimentos anatómicos de control independiente. Según otro ejemplo, Larsson (1992) estudió la diferente reactividad a la SDH entre las fibras que formaban unidades motoras concretas, del tibial anterior de la rata, con resultados de medidas constantes para diferentes edades y dependiendo de la posición de la fibra en el músculo, siendo un 21% menores en la superficie que en la zona media e interna. Esta diferencia sistemática de las fibras de una misma unidad motora, representa un hecho biológico más que un fenómeno metodológico y depende del músculo y especie estudiada.

5.5.- POSIBILIDAD DE CAMBIO EN EL TIPO DE DOTACIÓN FIBRILAR DEL MÚSCULO CON EL EJERCICIO.

Las fibras musculares esqueléticas se han clasificado en base a sus propiedades contráctiles y pueden ser identificadas por las características histoquímicas, inmunológicas, electroforéticas y bioquímicas de sus proteínas miofibrilares. Todos estos medios de trabajo han permitido la demostración del crecimiento en el número y longitud de las miofibrillas dentro de la célula muscular, así como la adición de nuevos elementos a partir de las células satélites, que justifica el aumento total de masa muscular. Pero aun persiste el dilema de la posible transformación entre los diferentes tipos de fibras de un músculo dado, en adaptación a un tipo de contracción rápida o lenta demandada por un ejercicio concreto.

La interconversión de las fibras implicaría cambios en las propiedades contráctiles y en la forma en que estas fibras son utilizadas durante el ejercicio. Sabemos que la mayoría de los músculos de los mamíferos presentan todos los tipos de fibras descritos en el apartado 3.3, en proporción que varía según el tipo de ejercicio al que están destinados, pero la posibilidad de un cambio metabólico sustancial que permita la transformación de unos tipos en otros, aun no está demostrado.

En el caso de valoración de estos cambios con el ejercicio, la conversión lógica corresponde a un incremento de fibras ST en respuesta al entrenamiento de resistencia, y un aumento en el porcentaje de fibras FT para aquellas actividades donde se requiera una contracción corta y explosiva (Edgerton y cols., 1969; Faulkner y cols., 1971). En este sentido podemos decir que el ejercicio produce en el músculo la hipertrofia de uno o más tipos de fibras y que lo produce en relación a cambios cuantitativos en el contenido miofibrilar, traducido en un incremento del área de corte. Si además hubiese una variación en la proporción del tipo de fibras, permitiría modificaciones completas y a voluntad de las características fisiológicas del músculo. Este hecho, hablaría a favor de conseguir resultados óptimos en un atleta inclinado a un tipo de ejercicio, aunque por el tipo de fibra muscular previamente desarrollado, el rendimiento se prevea bajo, siempre que el programa de entrenamiento complete este cambio progresivo en el desarrollo del tipo de fibra necesario para el ejercicio elegido.

Mero y cols. (1991) llevaron a cabo un estudio minucioso en niños de 11 a 13 años, en los que determinaron previamente su porcentaje de cada tipo de fibras, proponiendo después diferentes grupos, con un programa de entrenamiento adecuado o no, para el tipo de fibra predominante en cada uno. De sus resultados se desprende que la herencia afecta sólo parcialmente a la selección del deporte en el que se prevee mayor rendimiento, pero puede ser ampliamente modificado por el crecimiento, desarrollo y tipo de entrenamiento. La capacidad previa dependería del área de la fibra muscular, controlada por el sistema nervioso. No podemos olvidar que este desarrollo de un tipo de fibra muscular u otro, implicaría también variaciones en las placas motoras propias de cada tipo de fibra, que al fin y al cabo son las que parece que ejercen un control directo sobre su actividad (Close, 1972; Buchthal y Schmalbruch, 1980).

Atendiendo ya a casos concretos, vemos que son abundantes y dispares los datos aportados. Goldspink y Ward (1979), no han encontrado cambios en la proporción de los diferentes tipos de fibras, o en su número total, en el músculo en los levantadores de pesas. Sin embargo, había hipertrofia selectiva de algún tipo de fibra, dependiendo de la naturaleza del ejercicio y la localización del músculo. Aitken y cols. (1989) parten de hombres sanos a los que se somete a un programa de entrenamiento intensivo para fuerza y con muestras de vasto lateral, determinan que la proporción en los tipos de fibras varía, con un incremento de $5,9 \pm 2\%$ para las tipo IIa, una disminución de $6,3 \pm 2\%$ para las tipo I, manteniéndose constante las de tipo IIb ($0,4 \pm 0,9\%$).

Baker y Hardy (1989) estudian el proceso en canoistas y después de 9 semanas de entrenamiento, determinaron que la distribución de fibras no varía y la superficie de corte de las fibras tipo I no se altera significativamente, pero las de tipo II se incrementa en un 82%. Sin embargo, Kuzon y cols. (1990) no encuentra diferencias significativas en el porcentaje y áreas de cada tipo de fibras, entre futbolistas y hombres sedentarios

y Wang y cols. (1993), tras 18 semanas de entrenamiento para resistencia, encuentra una disminución en las IIb y un aumento en las IIa, con incremento de superficie y volumen en todos los tipos.

La diferente variación de los tipos de fibras entre hombres y mujeres, se ha valorado en el trabajo de Alway y cols. (1989), estudiando biopsias de bíceps braquial en culturistas de ambos sexos, implicando una proliferación que afectaba tanto a la hipertrofia de las fibras, como al número de ellas. Las fibras tipo II eran 1,6 veces mayores de tamaño en hombres que en mujeres, mientras que las tipo I presentaban superficies similares. Para este autor, estas aparentes adaptaciones pueden estar determinadas genéticamente. Bell y Jacobs (1990) desarrollan un protocolo similar comparando los dos grupos con otros dos grupos control, viendo como la proporción de fibras FT y ST es similar en mujeres control y con ejercicio, mientras que en el grupo masculino, las fibras FT aumentan más que las ST en hombres culturistas, en comparación con su respectivo grupo control.

Abernethy y cols. (1990) apoyan la teoría de que el ejercicio puede producir transición entre FT y ST. En sprinters entrenados hay un claro aumento de fibras FT en detrimento de las ST y en los atletas de resistencia hay un cambio desde el predominio FTb a FTa y un aumento en ST. Para estos autores, el cambio se produciría de FTb \Rightarrow FTa \Rightarrow FTc \Rightarrow ST, aunque también valora la posibilidad de que el alto porcentaje de fibras ST sea el resultado de una selección natural.

La clase de miosina que contiene cada tipo de fibra, va a determinar las diferencias básicas entre las distintas unidades motoras (Weeds, 1978). Estas diferencias hasta ahora se habían demostrado atendiendo a sus propiedades de contracción, rápida o lenta, que ya hemos planteado (Peter y cols., 1972; Fitts y Holloszy, 1977), pero las nuevas vías abiertas por la biología molecular en el estudio de miosinas y su determinación genética, ofrecen medios más rigurosos para valorar esta posibilidad de cambio.

La primera de estas situaciones de cambio se encuentra después del nacimiento. En este momento las fibras musculares estriadas de los mamíferos presentan unas propiedades contráctiles semejantes a las ST del músculo adulto (Buller y cols., 1960). En el periodo postnatal inmediato, la miosina del músculo fetal, inicialmente indiferenciada, cambia en algunas de ellas, tomando características asociadas a la miosina de fibras FT maduras (Drachman y Johnston, 1973; Whalen, 1980). La presencia de más o menos cantidad de cada miosina en el músculo fetal, es debida probablemente a la existencia de poliinervación en esta fase del desarrollo, que desaparece al madurar. La velocidad de cambio está en función del tamaño inicial de la fibra al nacimiento y la forma de empleo en la especie madura (Buller y Lewis, 1965; Close, 1972).

Este hecho de que una fibra muscular pueda contener proporciones diferentes de cada clase de miosina, aunque funcionalmente predomine uno de ellos (Kelly y Rubinstein, 1980; Weeds, 1978), posibilitaría la interconversión de los tipos de fibras en respuesta a perturbaciones experimentales como uso y desuso crónicos. Por tanto, la demostración de una clase de proteína contráctil en un tipo de fibra muscular, no excluye la existencia de los demás tipos.

Heylig y Pette (1980) demostraron en el sóleo de diferentes especies de mamíferos, la presencia de distintos RNAm en todos los tipos de fibras, que codificaban moléculas equivalentes en las cadenas ligeras de miosinas diferentes para determinar la diferenciación en fibras FT y ST. Estos diferentes fenotipos son el resultado de la transcripción de genes diferentes. Roy y cols. (1982) ya lo habían demostrado para las subunidades "a" y "b" de la tropomiosina. En el mismo trabajo, Heylig y Pette (1980), aportan las primeras observaciones sobre la aparición de cadenas L de miosina lenta en músculos con fibras FT estimulados para trabajo de resistencia y sugieren que la transformación inducida en la cadena L de la miosina es debida a un cambio en la transcripción genética.

Autores como Adams y cols (1993) ahondan en este planteamiento de cambios en los fenotipos de miosinas y continúan la línea de trabajo propuesta por Hather y cols (1991) que determinaron que el entrenamiento para resistencia aumenta el porcentaje de fibras tipo IIa y disminuye el tipo IIb. Ellos plantearon las variaciones de la cadena pesada de miosina (MHC) de estos subtipos y vieron que no había variaciones en las fibras tipo I, mientras que la proporción de la cadena MHCIIb, disminuye de 19 ± 4 a $7 \pm 1\%$ y aumenta desde 48 ± 3 a $60 \pm 2\%$ en la MHCIIa. A la vez el porcentaje de fibras IIb disminuye de 18 ± 3 a $1 \pm 1\%$ y las IIa aumenta de 46 ± 4 a $60 \pm 3\%$. Concluyen que el entrenamiento para resistencia altera la composición de la MHC del músculo esquelético humano, apoyando la teoría de la aparición de un cambio en la expresión genética.

El grupo de Andersen (1994) plantea un protocolo similar para atletas de velocidad, estudiando con electroforesis los tipos de MHC, sin encontrar diferencias significativas con el grupo control.

En los primeros estadios de desarrollo, los transcritos de las tres isoformas MHC de músculo rápido, siguen distintos patrones de distribución en cada fibra de los diferentes músculos. La MHCf adulta esta inicialmente coexpresada con las MHCemb y MHCneo, que progresivamente desaparecen en los primeros meses de vida, aunque persisten más en las fibras tipo IIa. Estas isoformas, en el músculo humano, siguen experimentando cambios con la edad y no están completamente establecidas hasta la edad adulta, dependiendo del tipo de vida y cantidad de ejercicio que desarrolle cada persona o animal considerado (Schiaffino y Reggiani, 1996).

**o
b
j
e
t
i
v
o
s**

6.- OBJETIVOS.

Durante las últimas décadas, la idea de que una cierta actividad física realizada con regularidad, es capaz de mejorar el nivel de vida del individuo, tanto si lo planteamos como factor preventivo, o como método de rehabilitación de enfermedades, se ha extendido ampliamente entre la población. Esto unido a la continua lucha por la superación de las limitaciones físicas del ser humano, ha llevado a numerosos autores al estudio exhaustivo de la composición de la fibra muscular (Huxley y Hanson, 1954; Moss y Leblond, 1971; Wang y cols., 1979; Tokuyasu y cols., 1983; Ordahl y Le Douarin, 1992; Scchiafino y Reggiani, 1996), su funcionamiento (Ogata, 1958; Dubowitz y Pearse, 1960; Schiaffino y cols., 1970; Ogata y Yamasaki, 1985; Billeter y Hoppeler, 1994) y sus variaciones a lo largo del entrenamiento.

Pero a pesar de la larga lista de publicaciones, todavía no se ha llegado a marcar un patrón de comportamiento definitivo, que oriente sobre la forma de ejercicio físico necesario para cada persona, o la preparación de programas de entrenamiento que consigan la mejor puesta en forma para un rendimiento óptimo.

Las fibras musculares estriadas esqueléticas, constituyen una población heterogénea de células, cuya importancia en el mantenimiento del equilibrio del organismo y la forma de adaptabilidad a diversas necesidades, todavía no está bien establecida, aunque se está empezando a comprender (Gollnick y cols., 1972; Sjoogard, 1982; Sjöström y cols., 1987; Always y cols., 1989; Neuffer y cols., 1996). Esta heterogeneidad se expresa por diferencias en sus características propias, como son la morfología, organización estructural, actividad enzimática, propiedades de su superficie celular y de la organización del citoesqueleto y capacidad funcional.

En conjunto, estas características determinan el fenotipo de las células, que difiere en las distintas circunstancias, como son las sucesivas fases de su desarrollo, el estado de actividad, la proporción variable de los tipos de células musculares en cada músculo y lo que es más habitual, una combinación de todos los factores.

El propósito de este trabajo ha sido estudiar cualitativa y cuantitativamente los cambios en las poblaciones de células musculares estriadas esqueléticas del músculo vasto externo, en condiciones de vida sedentaria y de vida deportiva, en sus dos vertientes, es decir, con ejercicio destinado a desarrollar resistencia, como el ciclismo, y con ejercicio destinado a desarrollar velocidad, como los corredores de distancias cortas.

Se ha elegido este modelo experimental, porque en él se han establecido ya una serie de cambios previos, que lo condicionan para obtener unos resultados seguros y útiles, que pueden significar una relación entre el tipo de fibra muscular existente y el rendimiento que aportan las variaciones que el ejercicio induce en ellas. Para llevar a cabo este estudio, se establecieron los siguientes enfoques:

1.- Determinar los cambios ultraestructurales desarrollados a lo largo de la práctica deportiva en cada una de las modalidades planteadas.

2.- Caracterizar mediante marcadores enzimáticos la localización y los cambios experimentados por los diferentes tipos de fibras musculares, durante el periodo de entrenamiento considerado.

3.- Establecer los cambios cuantitativos en la población de células musculares esqueléticas con el ejercicio y correlacionarlos con los datos aportados por los procedimientos morfológicos e histoquímicos.

4.- Correlacionar estos datos con los cambios producidos en la vascularización del tejido conjuntivo circundante y en relación con la modalidad y duración de la actividad deportiva.

M y
a
t m
e é
r t
i o
a d
l o

7.- MUESTRA.

Para llevar a cabo este protocolo experimental, hemos utilizado una pequeña porción del músculo vasto externo humano, obtenida por punción biopsica percutánea, en una población previamente seleccionada de deportistas y personas de vida sedentaria. En un primer momento, nos pusimos en contacto con la Federación Española de Ciclismo y Atletismo, que nos orientó sobre los clubes que podrían estar interesados en nuestro estudio, y con un grupo de alumnos de la Facultad de Medicina de la U.C.M.

7.1.- SELECCIÓN DE LA MUESTRA.

La selección de la muestra se llevó a cabo en varias fases, primero se envió a los entrenadores de los distintos clubes deportivos, una breve explicación de la técnica de la biopsia y los posibles riesgos y traumatismos que conlleva, así como los beneficios que puede reportar a la orientación de las técnicas de entrenamiento para la obtención de un mejor rendimiento individual. Esta información se acompañó del modelo de ficha, que debían rellenar los atletas, para su distribución entre los que voluntariamente quisieran ser incluidos en este trabajo (Figura 33).

Una vez realizada la primera selección por parte de los entrenadores y remitidas las fichas a nosotros, separamos todas ellas en dos grandes grupos: a) deportistas de resistencia, ciclistas y b) deportistas de velocidad, corredores de 100/400 m. Dentro de cada uno de estos dos grupos se volvieron a seleccionar los atletas que hubieran empezado su actividad deportiva de una manera reglada entre los 16 y 18 años y por último se llevó a cabo una subdivisión entre aquellos cuya actividad deportiva tenía una duración entre 4 y 6 años y los que llevaban practicándola entre 8 y 10 años. El resultado final de la selección, después de desechar los extremos, para que la muestra fuera homogénea, nos proporcionó cuatro grupos de atletas, dos con una edad media de 21 años y 3 a 5 de vida deportiva (R21 y V21), y otros dos de 25 años y 7 a 9 de vida deportiva (R25 y V25), tanto de resistencia como de velocidad (Figura 34).

El grupo control fue seleccionado entre la población voluntaria de estudiantes anteriormente reseñada y que no había practicado ningún deporte habitualmente, previa información del proceso experimental igual que al grupo de deportistas. Se dividieron en tres subgrupos que corresponden a edades de 18, 21 y 25 años (C18, C21 y C25) (Figura 34).

Num. _____

APELLIDOS _____ NOMBRE _____
 Fecha de nacimiento _____ Lugar _____ Provincia _____
 Domicilio actual _____
 Num. _____ Psc. _____ Código Postal _____ Teléfono _____
 Taille _____ cm. Peso _____ Kgr. Sexo: V ☐ H ☐ Edad _____
 Actividad física que desempeña _____
 Tiempo que viene desarrollando dicha actividad física (meses) _____
 Forma de desarrollo: Continuada ☐ Discontinua ☐
 Tipos de pruebas que realiza _____
 Realiza competición: SI ☐ NO ☐
 Nivel de competición: Internacional ☐ Nacional ☐ Provincial ☐ Regional ☐ Local ☐
 Enunciado: Describa minuciosamente el tipo de entrenamiento que realiza, especificando todas las parámetros (duración, intensidad, cargas, frecuencia, etc...)

● Entrenamientos puntuales y forma abreviada

● Usos de deportes y/o laborales

● ¿Qué resultados espera obtener de la prueba?

● OBSERVACIONES

Figura 33.- Modelo de ficha que se distribuyó entre atletas y entrenadores, de los distintos clubes deportivos.

Por último, una vez seleccionadas las fichas, nos pusimos en contacto con los interesados y sus entrenadores, para llevar a cabo mesas redondas explicativas y documentales sobre la técnica y cuantos pormenores planteasen sobre el tema. Estas reuniones se efectuaron en grupos homogéneos. Con los parámetros que hemos expuesto, la distribución final de la muestra y sus respectivos componentes, queda reflejada en los siguientes grupos:

GRUPO R21: Deportistas de resistencia que llevaran realizando deporte entre 4 y 6 años, 10 componentes.

GRUPO R25: Deportistas de resistencia que llevasen realizando deporte entre 8 y 10 años, 10 componentes.

GRUPO V21: Deportistas de velocidad que llevaran realizando deporte entre 4 y 6 años, 10 componentes.

GRUPO V25: Deportistas de velocidad que llevasen realizando deporte entre 8 y 10 años, 10 componentes.

GRUPO C18: Grupo control de 18 años, 5 componentes.

GRUPO C21: Grupo control de 21 años, 5 componentes.

GRUPO C25: Grupo control de 25 años, 5 componentes.

7.2.- TÉCNICA DE LA BIOPSIA.

7.2.1.- Características de la aguja.

Para la realización de la biopsia muscular se utilizó la aguja de Bergstrom (1962). Esta aguja de biopsia consta de tres partes. La primera de ellas está constituida por un cilindro hueco, de paredes finas y un diámetro entre 3 y 5 mm. En su extremo distal acaba en forma puntiaguda. Aproximadamente 8 mm. antes de que este cilindro empiece a tomar su forma afilada, posee una pequeña ventana, por donde se introducirá, al ejercer presión sobre el músculo, una porción de éste. El segundo componente consiste en un cilindro también hueco con su extremo distal cortante, que una vez introducido en el primer componente servirá para seccionar el fragmento muscular eventrado por la pequeña ventana. Por último se completa este instrumento con una varilla maciza que se introduce en el segundo componente y nos permite desalojar de la aguja la pieza obtenida.

7.2.2.- Toma de muestras.

En nuestro protocolo siempre hemos utilizado como zona de biopsia, la porción media del músculo vasto externo (Figura 35). Se rasura y desinfecta la zona a biopsiar

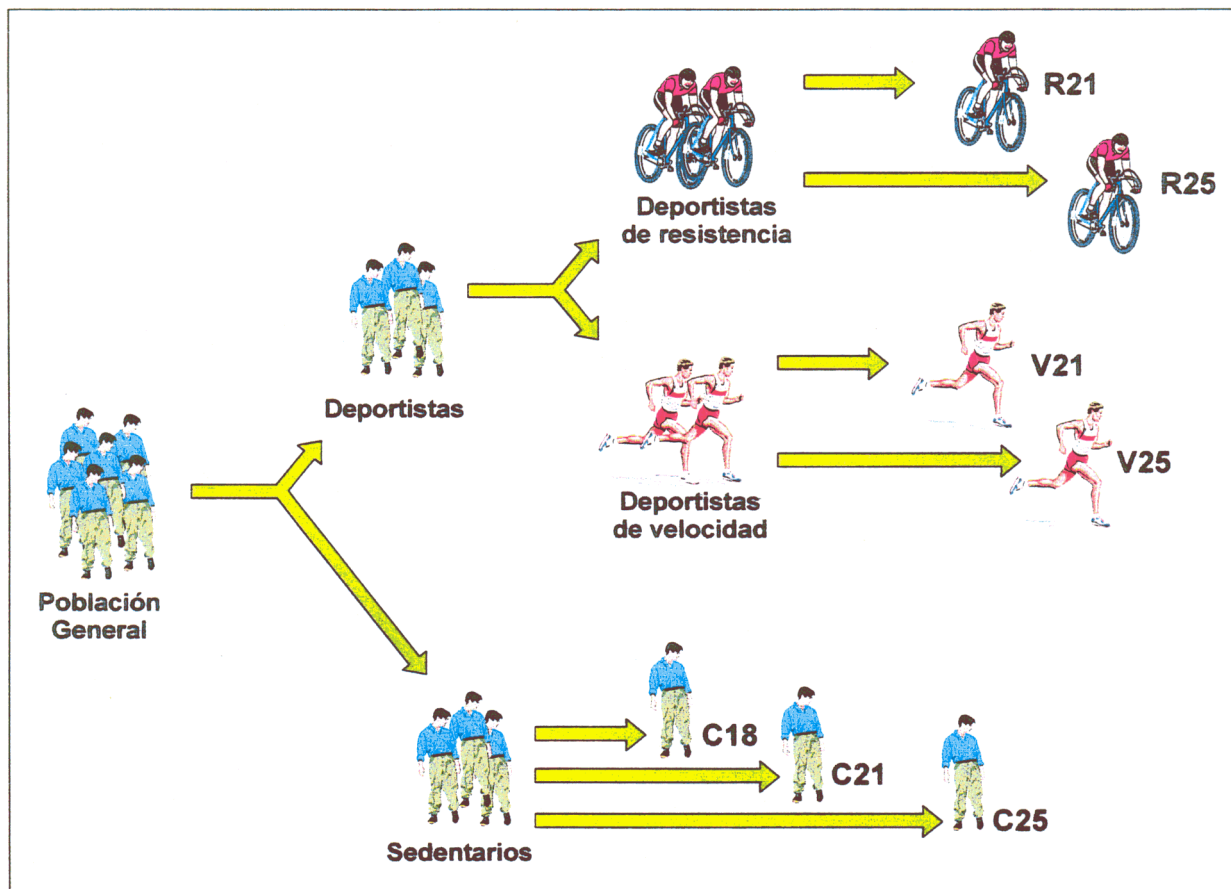


Figura 34.- Representación esquemática de la selección de la muestra, con la formación de los distintos grupos control (C18, C21 y C25), de resistencia (R21 y R25) y de velocidad (V21 y V25).

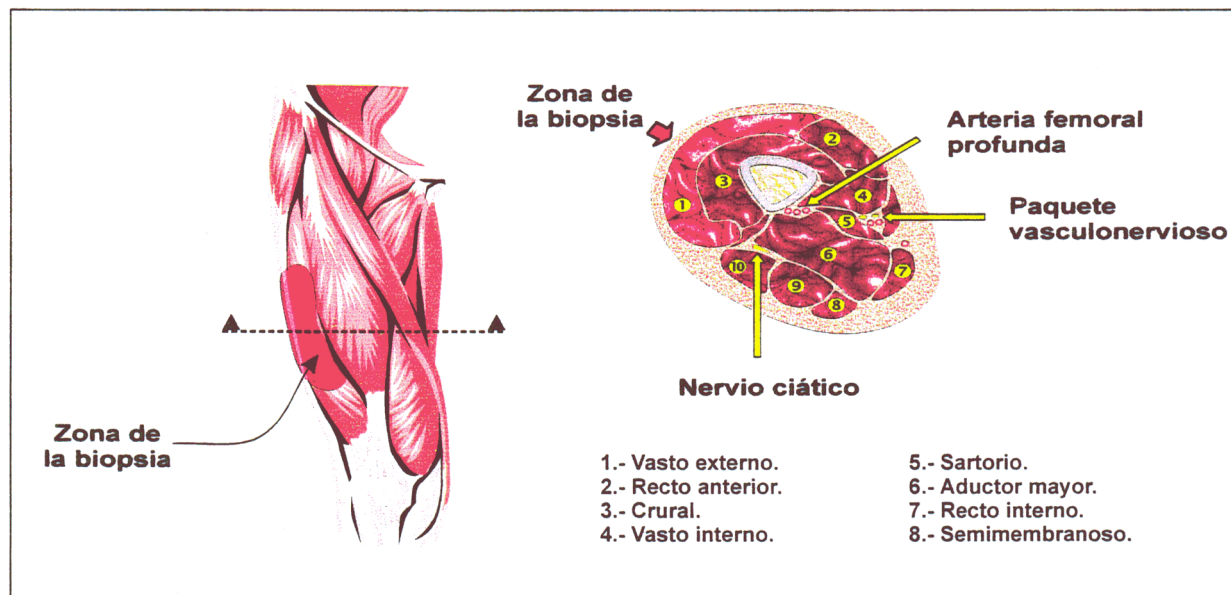


Figura 35.- A la izquierda, localización anatómica de la zona de realización de la biopsia. Derecha, sección transversal del muslo a nivel de la zona de biopsia, con representación de las relaciones de sus componentes.

y se anestesia localmente el punto elegido con Scandinibsa al 1% (Lab. Inibsa), procurando no profundizar más allá de la fascia muscular. Utilizando un bisturí, provisto de una hoja fina (Swann-Morton nº15, Sheffield-Engl.), realizamos una pequeña incisión de aproximadamente 5-7 mm. de longitud con una profundidad que depende de la localización de la fascia en cada donante.

A través de este pequeño ojal se introduce la aguja de biopsia montada con sus dos primeros componentes, de tal manera que la ventana quede ocluida mediante el cilindro interior cortante. Se profundiza en la masa muscular, perpendicularmente a la superficie de la piel, hasta llegar a la profundidad previamente establecida en cada caso. A continuación elevamos el cilindro cortante, para dejar abierta la ventana del primer componente, ejerciendo al mismo tiempo una presión lateral contra el músculo, con la porción de la aguja que posee el orificio y de esa manera conseguir que una parte de la masa muscular penetre en la pequeña ventana. En ese momento volvemos a deslizar el cilindro cortante, hasta que llegue a su posición original seccionando de esta manera un pequeño pero suficiente fragmento de músculo (Figura 36). Se retira la aguja con la pieza obtenida, haciendo una presión digital sobre la incisión, aproximando los bordes y fijándolos con sutura adhesiva.

Cada fracción extraída, fue colocada independientemente en una cápsula de Petri de poliestireno de 35x10 mm., determinándose los pesos respectivos. Las cápsulas habían sido taradas con anterioridad. A continuación, cada muestra fue dividida, bajo control de una lupa binocular Nikon TK-870E, en tres fracciones de dimensiones aproximadamente iguales, para procesar según las técnicas previstas (Figura 37).

7.2.3.- Características del músculo vasto externo.

Este músculo es la porción mayor del cuádriceps crural. Nace por una aponeurosis que se inserta en la porción superior del fémur y cubre los tres cuartos superiores del músculo. La masa muscular cubre también la porción antero-externa del muslo y acaba mediante un robusto tendón plano en la rotula.

Se ha elegido este músculo, por su localización superficial, fácilmente accesible a este tipo de biopsia, menos cruenta y con menos inconvenientes para que el donante continúe con su vida normal. Además es un músculo utilizado continua y plenamente para en trabajo mecánico demandado en ambos grupos de deportistas. Desde el punto de vista histológico, presenta la ventaja de ser un músculo mixto (FT y ST) y tener una composición bastante uniforme, en cuanto al tipo de fibras musculares, desde el extremo proximal al distal. Si consideramos la diferencia de distribución en el corte

Técnica de la biopsia con aguja

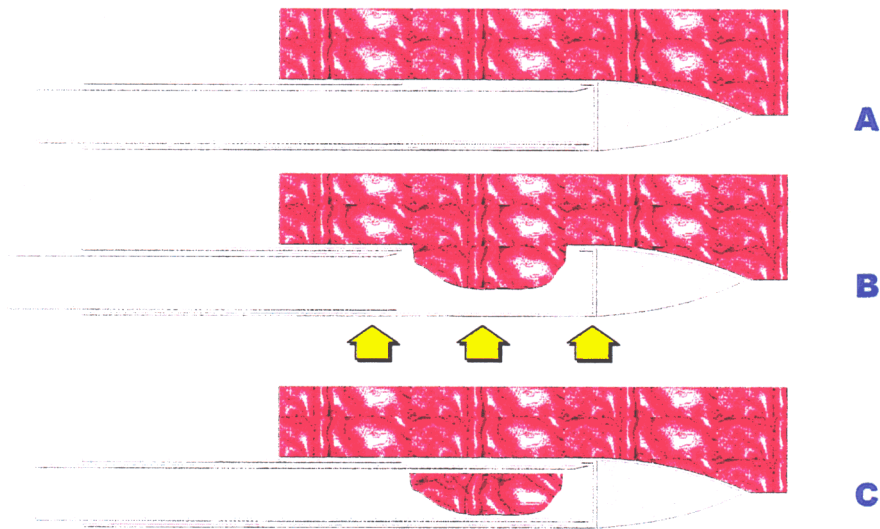


Figura 36.- Representación esquemática de la toma de muestras. En A, se introduce la aguja con el cilindro cortante bajado. En B, se retira el cilindro cortante y se presiona la aguja contra el músculo, por último en C, se vuelve a bajar el cilindro interior cortante y se obtiene un fragmento muscular.

Procesamiento de las muestras

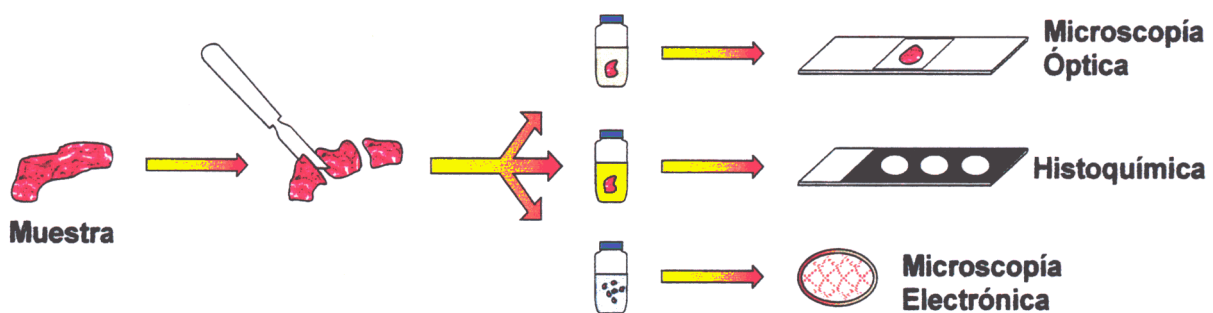


Figura 37.- Protocolo de estudio morfológico del músculo estriado esquelético vasto externo. Las muestras extraídas se dividieron en tres partes, que se destinaron a estudios histológicos rutinarios, histoquímica y microscopía electrónica.

transversal, varía muy poco la expresión predominante de formas rápidas, en la zona superficial y formas lentas, en la zona profunda (Lexell y cols., 1983; Sjöström, 1982; Staron, 1997), por lo que pequeñas variaciones en las coordenadas del punto de biopsia, no modifican el resultado final.

8.- PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS PARA ESTUDIO HISTOLÓGICO.

8.1.- MICROSCOPIA ÓPTICA.

La porción de tejido destinada al estudio morfológico con microscopía óptica, fue fijada por inmersión en líquido de Bouin débil con ácido acético al 3% (Romeis, 1928), durante 24 horas y a una temperatura de 4°C.

Después de un lavado en alcohol de 70° durante 24h a 20°C y en agua corriente, para extraer el exceso de ácido pícrico del tejido, las piezas fueron deshidratadas en alcohol etílico de graduación creciente y toluol para incluirse finalmente en parafina. Los cortes de un grosor de 7 a 8 µm se obtuvieron usando un microtomo Leitz-1512.

Las tinciones seleccionadas fueron: a) Hematoxilina-Eosina (Heidenhain, 1896) en uno de cada tres cortes seriados, tanto para el estudio básico del tejido, como para determinar las técnicas a utilizar en el resto de los cortes, b) PAS-Schiff (Hotchkiss, 1948; McManus y Lillie, 1948), c) tricrómico de Gomori (Francis, 1982) y d) reticulina (Gomori, 1937)

Para el estudio de las diferentes series de cortes se ha utilizado un microscopio LEITZ-DIALUX, equipado con una cámara WILD MPS 51S con Photoautomat MPS-4S.

8.2.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Una porción de la pieza obtenida mediante aguja como describíamos anteriormente, fue fijada por inmersión en glutaraldehído al 4% en tampón fosfato (Sorensen) 0,1 M, pH 7,2 a una temperatura de 4°C y con una osmolaridad de 440 mOsm/ml, ajustada mediante la adición de cloruro sódico. Estos valores fueron establecidos como óptimos por Schultz y Karlson en 1965. Las piezas permanecieron en estas condiciones durante un plazo de 24h, recibiendo un nuevo tallaje a las 3h del comienzo del proceso. En un paso siguiente se lavaron en buffer fosfato 4 veces, para extraer todo el fijador.

A continuación se procedió a la osmificación con tetraóxido de osmio al 2% disuelto en tampón fosfato a pH 7,2. Se deshidrataron por medio de acetonas de

concentraciones crecientes y se transportaron en óxido de propileno. Se infiltran en Vestopal y se incluyen en cápsulas de gelatina (Luft, 1961).

De todas las piezas se realizaron cortes de control con un piramidotomo LKB, de 1 a 2 μm y se tiñeron con azul de metileno-borax-azul de toluidina (Kallman, 1971). Con el estudio de estos cortes panorámicos se seleccionaron las áreas de tejido para ultramicrotomía.

Los cortes ultrafinos se realizaron en un ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut-E, provisto de cuchilla de vidrio, recogiénose en rejillas HR26 de cobre (Thab Laboratories, Ltd, England). Estas rejillas con los cortes se contrastaron en una solución saturada de acetato de uranilo durante 30-45 minutos, se lavaron después con 4 pases de agua tridestilada y se dejaron secar durante 5 minutos (Watson, 1958).

Posteriormente las rejillas se tiñeron durante 5-10 minutos en citrato de plomo al 0,5% en sosa 0,02 M recién hecha, se lavaron nuevamente en una solución de sosa 0,02 M, seguido de tres cambios de agua destilada y se secaron (modificación al método descrito por Venable y Coggeshal, (1965).

Una vez listos los cortes fueron estudiados en un microscopio electrónico Zeiss M-902 con un potencial de aceleración de 100 Kv perteneciente al Centro de Microscopía Electrónica "Luis Bru" de la U.C.M.

9.- PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS PARA ESTUDIO HISTOQUÍMICO.

La porción de tejido destinada al estudio histoquímico, se depositó en una rejilla y fue cubierta por una gota de OTC-Compound (Miles Laboratories, Inc. Naperville, Illinois. EE.UU) para posteriormente ser congelada en alcohol isopropílico que había sido enfriado aproximadamente a -160°C en nitrógeno líquido. A continuación fueron almacenadas en un arcón frigorífico a -80°C hasta su posterior procesamiento. Se cortaron en secciones de aproximadamente $10\mu\text{m}$. y a una temperatura entre -20°C y -25°C en un criostato-microtomo International Equipment Company (Needham Heights. Mass. EE.UU).

9.1.- TÉCNICAS ENZIMÁTICAS UTILIZADAS.

Las técnicas histoquímicas utilizadas para el estudio y clasificación de los distintos tipos de fibras, estuvieron encaminadas a determinar las diferentes vías metabólicas, oxidativas y glicolíticas, y la mayor o menor actividad de cada una de ellas

en los cortes estudiados. Fueron seleccionadas como más significativas, la ATPasa, con preincubación alcalina y ácida, a pH 9'4, 4'6 y 4'3 (Brooke y Kaiser, 1970; Round y cols. 1980), NADH-TR (Nachlas y cols., 1958a y b), SDH (Wachstein y Meisel, 1955), citocromo oxidasa (Oda y cols. 1958), fosforilasa (Goldewski, 1963) y PAS (Schiff, 1866 y McManus, 1946).

Previo fijación de los cortes o simple secado parcial al aire, según los casos, se incubaron con los productos precisos, en máxima garantía de pureza, para poner de manifiesto las enzimas que actúan sobre los diferentes sustratos.

El método para la ATPasa está fundamentado en el desdoblamiento enzimático del ATP, mediante la ATPasa, en ADP más ácido fosfórico, que posteriormente reacciona con iones cálcicos y sulfuro de cobalto.

La técnica se lleva a cabo a diferentes pH, para poner de manifiesto los distintos tipos de fibras. En el primer caso de demostración de la ATPasa, se incubaba la muestra durante 30 minutos a temperatura ambiente, con una solución de 5 mgr de ATP en agua destilada, con 10 ml de buffer glicina/NaCl 0'1 M con CaCl_2 0'75 M y pH ajustado a 9'4, añadiendo a continuación 0'03 gr/10 ml de solución de dithiotheritol. En el segundo y tercer caso, la preincubación se lleva a cabo durante solo 10 minutos y a 4°C, en solución de buffer acetato de sodio 0'1 M con adición de EDTA 10 M, ajustando a pH 4'6 o 4'3. El resto del procesamiento, sigue los pasos de rutina hasta su deshidratación y montaje.

El resultado es un corte transversal de fibras musculares estriadas esqueléticas en color pardo de diferente intensidad para cada tipo de fibra, en función del pH utilizado.

El método de demostración de la SDH está basado en la liberación de hidrógeno que realiza la SDH a partir del sustrato succinato sódico. Los hidrógenos liberados reducen las sales de tetrazolio en forma de sustancias no coloreadas hasta azul formazán, que posteriormente es quelado con iones cobalto, para producir un depósito insoluble de color azul.

Los cortes se fijan en un baño de acetona helada y se incuban de 30 minutos a 1 hora a 37°C en una solución de 2'5 ml de Nitro-azul de tetrazolio ($\text{NAT} \rightarrow 4\text{mgr / ml}$), con 2'5 ml de tampón fosfato 0'2 M a pH 7'4, 1 ml de MgCl_2 0'05 M y 3 ml de agua destilada, ajustando el pH a 7'0 con HCl 0'2 M. Pasar a formal al 10% durante 10 a 15 minutos, enjuagar con agua corriente y montar en medio acuoso.

El resultado es una coloración azul de diferente intensidad, según el contenido mitocondrial del tipo de fibra muscular que estemos considerando.

Las diaforasas son enzimas que transportan hidrógeno desde el sustrato de la succinodeshidrogenasa, hasta los aceptores de NADH y NADPH, desde donde es transferido a la citocromo oxidasa, que contiene oxígeno, como aceptor natural del hidrógeno transportado. Al igual que las demás enzimas mitocondriales es capaz de reducir sales de tetrazolio a formazanes coloreados tras su quelación con sales de cobalto a pH básico.

En el procesamiento para poner de manifiesto estas diaforasas con NADH-TR, la incubación se llevó a cabo durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Para la solución madre se han utilizado 6'25 ml de NAT (20 mgr/20 ml de agua destilada), con 6'25 ml de buffer Tris-clorhídrico 0'2 M, añadiendo 1'25 ml de CoCl_2 0'5 M y 8'75 ml de agua destilada. La solución de incubación se obtiene con 1 ml de solución madre, más 1 mgr de NADH, añadiendo la coenzima justo en el momento de su utilización. Tras el resto del proceso habitual y contrastada con verde metileno al 2%, se monta en glicerina Jelly.

Se obtienen cortes en gradación decreciente de azul-negro, desde las fibras tipo I a tonos pálidos en las tipo II.

Para caracterizar otra de las enzimas en relación con el metabolismo oxidativo, propio de la cadena respiratoria celular, se ha utilizado la citocromo oxidasa, por ser una transportadora de electrones de gran actividad en condiciones normales y tiene valor de patrón de distribución a la hora de evaluar el funcionamiento del metabolismo mitocondrial.

En cortes histológicos sin fijar, se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas, en una solución compuesta por 1 ml de catalasa (20 $\mu\text{gr}/\text{ml}$), con 10 mgr de citocromo C, 9 ml de tampón fosfato 0'1 M a pH 7'4 y 5 mgr de 3.3'-DAB. El pH se ajusta a 7'4 con NaOH 0'1 M. Se sigue un lavado en agua destilada para fijar 15 minutos en formol calcio y contraste con hematoxilina, con montaje de rutina.

Se obtienen cortes de fibras musculares en color pardo de diferente intensidad, caracterizando fibras de mayor o menor cantidad de metabolismo oxidativo.

La valoración del metabolismo glicolítico puede hacerse estudiando las enzimas que intervienen en el metabolismo de la glucosa, localizadas en el citoplasma. La

formación de glucosa-1-fosfato a partir del glucógeno, se realiza por la acción de una fosforilasa en presencia de ATP, y a su vez y en una cascada de reacciones catalizadas por distintas enzimas, esta forma de glucosa va pasando a glucosa-6-fosfato, etc, hasta llegar a ácido pirúvico. Por tanto, la determinación de la fosforilasa constituye una medida de la llave de estos procesos metabólicos.

El medio de incubación de la fosforilasa está compuesto por 50 mgr de glucosa-1-fosfato, con 10 mgr de AMP, 25 mgr de EDTA, 20 mgr de NaF, 1 gr de Dextran, 6 ml de buffer acetato (0'1 M y pH 5'9) y 1 ml de alcohol absoluto. Tras un breve secado al aire, la incubación se hace durante 1 h a 37°C, siguiendo el procedimiento de rutina.

El resultado esta formado por cortes en los que se alternan diferentes grados de color morado rojizo, dependiendo de la cantidad de sustrato de cada tipo de fibra.

Otra forma de valorar la cantidad y distribución de glucógeno en estas células es con el método del ácido peryódico de Schiff, obtenido a partir de fucsina básica tratada con ácido sulfuroso. Este producto es capaz de reaccionar con dos grupos aldehídicos contiguos, existentes en los hidratos de carbono, apareciendo una coloración rojo fucsia característica.

Para el método de PAS, los cortes se fijaron en etanol acético durante 10 minutos, para hacerlos reaccionar después con ácido peryódico al 0'5% durante 2 a 5 minutos, y el reactivo de Schiff (Fucsina básica 1 gr, más 200 ml de agua destilada, a los que se añaden 2 gr de metabisulfito sódico, 2 ml de HCl concentrado, decolorando con 2 gr de carbón), que es el procedimiento habitualmente utilizado en el laboratorio.

Este método puede colorear numerosos componentes bioquímicos, siendo poco específico si se utiliza aislado, pero puede convertirse en enormemente selectivo, mediante los correspondientes controles.

9.2.- LOCALIZACIÓN DE LAS POBLACIONES CELULARES EN LOS CORTES HISTOLÓGICOS.

Los cortes teñidos con las distintas técnicas histoquímicas, han sido estudiados con un microscopio LEITZ-DIALUX y fotografiados con un sistema WILD MPS 51S con Photoautomat MPS-4S y película Agfachrome RSX 100 Profesional, procurando utilizar la misma zona en cortes sucesivo, para una mejor verificación de resultados.

Los cortes seriados, con las técnicas sistemáticamente alternadas de la amplia batería de reacciones enzimáticas que hemos utilizado, permiten un estudio y clasificación de los distintos tipos de fibras musculares absolutamente fiable, eliminando el posible riesgo de que la manipulación del tejido haya producido un desplazamiento de enzimas y permite corroborar si una determinada célula, no metaboliza el sustrato o se encuentra en un momento metabólicamente distinto (Figura 38).

10.- ANÁLISIS DE IMÁGENES, MÉTODO ESTADÍSTICO Y TRATAMIENTO INFORMÁTICO.

La composición fibrilar fue expresada en porcentajes de los tipos de fibras, basados en la reacción de la ATPasa a los pH anteriormente reseñados, que nos proporcionan la identificación de los tipos de fibras I, IIa, IIb y IIc, según la clasificación de Brooke y Kaiser (1970), y contrastadas con el resto de sustratos utilizados. Sobre un mínimo de 100 fotografías de diferentes campos en cada caso, tomadas al mismo aumento, se han contado las fibras de cada tipo y se han procesado los datos en el sistema de análisis semiautomático.

El área transversal fue estudiada a partir del mismo material que para el caso anterior, proporcionando al autoanalizador datos perimétrales de cada fibra de un mismo tipo, para hallar el área media en cada caso.

La densidad de volumen mitocondrial fue estimada, determinando los principales parámetros en fotografías de microscopía electrónica de cortes de tejido a intervalos regulares y sistemáticos, utilizando por lo menos 10 cortes de cada bloque, con una media de cinco bloques por donante, y con una ampliación de 30000x (Figura 39). El espacio referencial fue el volumen total de la fibra. La estimación de volúmenes de las mitocondrias por unidad de volumen de fibra muscular, fue obtenido por procedimiento estereológico standard (Weibel 1977).

El estudio de la variación de capilares en nuestra muestra, se llevó a cabo por microscopía óptica, a partir de fotografías de cortes del tejido teñidos con el método de PAS y en cortes semifinos de 1 μm , teñidos con azul de toluidina. Los resultados se expresaron en número de capilares por mm^2 de tejido superficie de corte transversal del tejido muscular.

Para la realización de este trabajo y redacción del manuscrito se contó con un equipo informático compuesto por los siguientes elementos. En primer lugar un

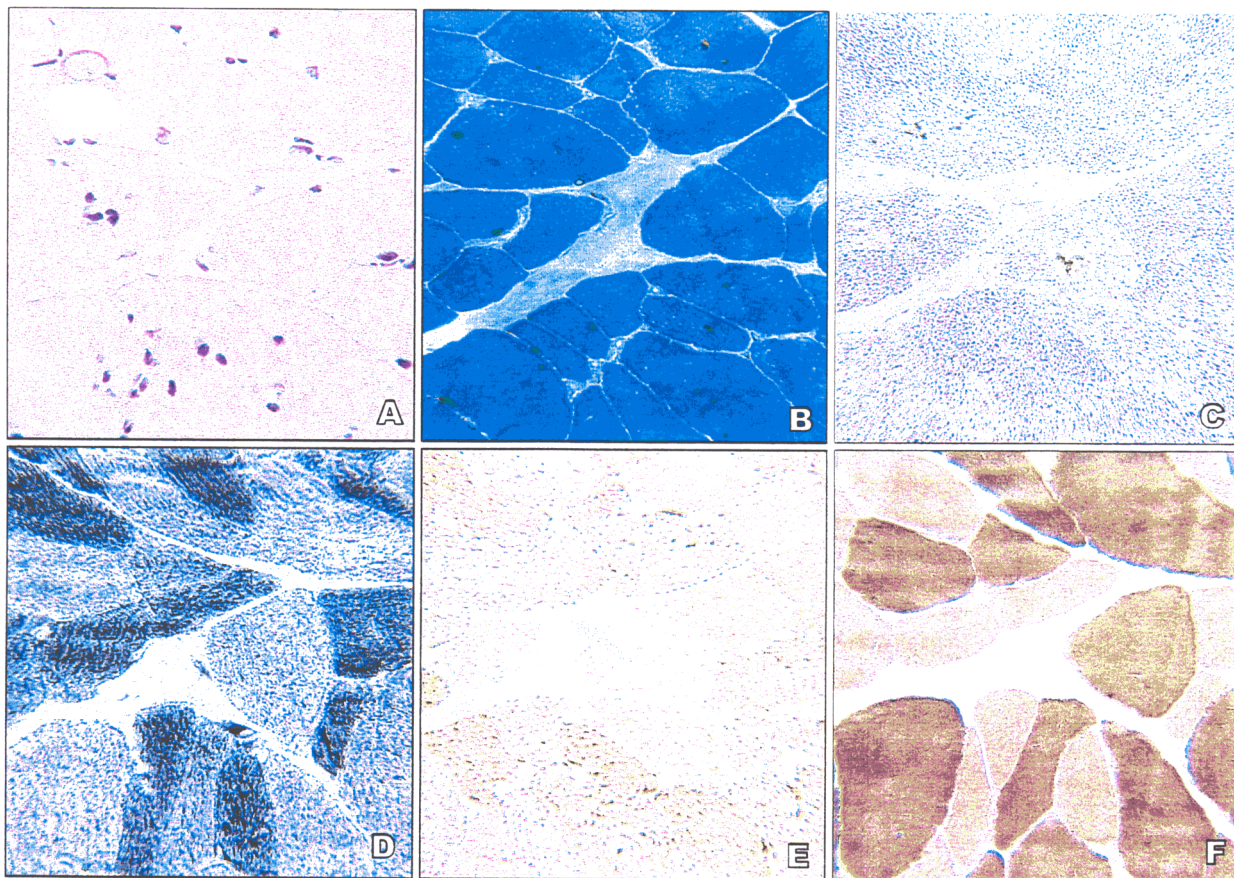


Figura 38.- Batería de técnicas histológicas e histoquímicas para determinación rutinaria de la población celular de nuestro estudio y su caracterización funcional: **A.-** Hematoxilina-Eosina. **B.-** Tricrómico de Gomori. **C.-** SDH. **D.-** NADH-TR. **E.-** Citocromo-Oxidasa. **F.-** ATPasa.

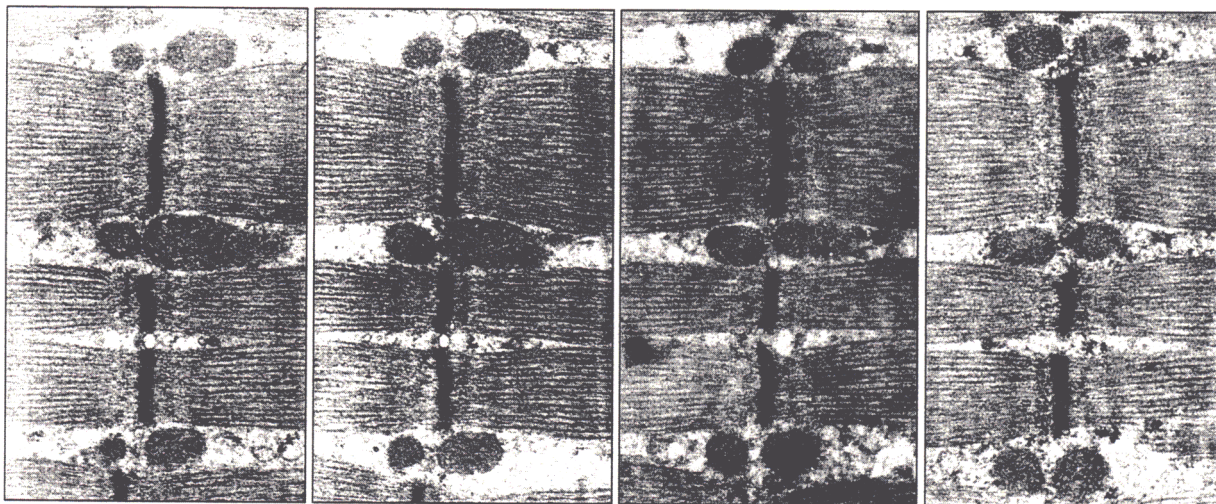


Figura 39.- Sucesión de imágenes obtenidas a partir de cortes seriados ultrafinos, estudiados con MET, para estimación de volúmenes por procedimiento estereológicos standard.

ordenador COP-Pentium a 233 Mhz como unidad central, con sistema operativo Windows 95 de Microsoft Corporation.

El texto fue redactado y compuesto con el paquete informático de tratamiento de texto, Corel WordPerfect v.8 de Corel Corporation y Corel Corporation Limited. En cuanto a la digitalización de imágenes, contamos con un scanner ScanJet IIc de Hewlett Packard y software Desk Scan II V.1 de la misma empresa, que posteriormente y junto a los dibujos fueron tratadas con los programas Corel Photo-Paint v.8 y Corel Draw v.8 ambos de Corel Corporation y Corel Corporation Limited. Para la toma de datos y su posterior análisis estadístico se empleo el paquete informático SPSS v 7.5 de SPSS Hispanoportuguesa aunque para los gráficos y tablas estadísticos preferimos el programa Corel Chart v.5 de Corel Corporation que a nuestro juicio tiene mayores posibilidades gráficas.

Tanto las distintas microfotografías electrónicas como las preparaciones para microscopía óptica, fueron analizados mediante un sistema de análisis semiautomático VID IV de Metagraphius Software Corporation, compuesto por un ordenador COP-386 con el software específico, dos monitores Eizo de alta resolución en color, uno de ellos para la entrada de datos y el otro para la visualización y manipulación de la misma. Todo ello iba conectado a una videocámara JVC TK-870E que se encontraba montada en un microscopio LEITZ-1512, cuando se trataba de preparaciones de microscopía óptica o bien a una mesa de reproducción cuando lo analizado eran microfotografías electrónicas.

Resultados

11.- VARIACIONES CUALITATIVAS DE LAS FIBRAS MUSCULARES EN RELACIÓN CON EL EJERCICIO FÍSICO.

Los cortes histológicos obtenidos a partir de las muestras biopsiadas en el músculo vasto lateral externo de los sujetos control y de los atletas, se han procesado para estudio con microscopía electrónica y han aportado una serie de datos morfológicos y ultraestructurales que nos permiten hacer un estudio comparativo entre los diferentes grupos del protocolo experimental y valorar la influencia del ejercicio sobre cada tipo de fibra muscular, dependiendo de la modalidad de ejercicio y del tiempo dedicado a su realización.

Estudios parciales de estas modificaciones han sido aportados por numerosos autores, como ya hemos visto en el apartado dedicado a revisión bibliográfica, por lo que sólo vamos a mostrar aquí, aquellos más llamativos y característicos en cada grupo de deportistas, puesto que la población control se adapta a una morfología típica y normal de las células musculares estriadas esqueléticas.

El estudio ultraestructural va a servirnos también, como punto de apoyo y fundamentación de los datos cuantitativos obtenidos a partir de técnicas histoquímicas y mediante el analizador de imágenes.

11.1.- VARIACIONES EN LOS ATLETAS DE RESISTENCIA. GRUPO R21.

Los cortes obtenidos a partir del músculo vasto lateral externo de los atletas dedicados al ciclismo durante, por lo menos, tres años, presentan al corte transversal o longitudinal, unas células de anchura bastante similar entre ellas, dejando espacios intercelulares de dimensiones similares a las que encontramos en los estudiantes de la población control.

En el corte longitudinal, se distingue una porción central, de anchura bastante homogénea y longitud que, evidentemente, no podemos seguir en toda su extensión. En algunas zonas pueden verse los extremos de terminación o de comienzo de esa misma fibra que estamos considerando, o de las contiguas. En esos casos vemos cómo la ya mencionada anchura homogénea empieza a disminuir progresivamente, hasta terminar casi siempre en un extremo afilado (Figuras 40 y 41). En ambas zonas podemos observar variaciones, que nos orientan a describirlas como la base morfológica del crecimiento de estas fibras musculares, tanto en su porción longitudinal, como en la transversal.

Las zonas de crecimiento longitudinal de la célula muscular, que coinciden con estos extremos afilados, llaman la atención por dos tipos de imágenes. Por un lado, cuando no aparecen núcleos en esta posición y las dos células musculares acaban enfrentadas en disposición término-terminal (Figura 40), la imagen habitual de la estructura de la membrana celular con sus dos hojas, en cada una de estas células, se pierde aparentemente difuminada, sin que podamos distinguir límites precisos, aunque en algunas zonas parece vislumbrarse, pero solo como plasmalema, sin lámina basal. En el espacio intercelular a ese nivel se concentra una mayor cantidad de un material de densidad media y aspecto fibrilar.

En el espacio intracelular, en el límite con esta rarefacción de la membrana, localizamos un material granular algo más denso en el hialoplasma, tapizando la zona de finalización de las miofibrillas. En los extremos de las miofibrillas, que se acaban en las proximidades de la membrana a este nivel, no se ven líneas Z, sino que siempre terminan con desflecamiento I, A-I o A. En esta forma de terminación, tampoco se detectan mitocondrias, aparte de las localizadas entre las miofibrillas.

En otros casos hemos conseguido el corte con núcleos en ese extremo final (Figura 41). Esta imagen aparece con mucha frecuencia y pueden encontrarse solos, o próximos a alguna célula satélite, que se aloja en una excavación de la célula, a pesar de la presión que el crecimiento longitudinal ejerce a este nivel.

El citoplasma de las células satélites en este extremo final (Figura 41 CS), es bastante electrodenso y en él pueden apreciarse pequeñas cisternas de retículo endoplásmico rugoso, que nos orientan hacia un proceso más activo de síntesis proteica. La cromatina de su núcleo, se distribuye como una fina banda de heterocromatina pegada a la carioteca y grumos dispersos homogéneamente. Empieza a presentar invaginaciones que le dan un aspecto más irregular y la zona de los poros nucleares aparece marcada por la falta de cromatina a su nivel. No se ven nucleolos con frecuencia.

Los núcleos de los miocitos de esta localización (Figura 41 M), pierden sus características, volviéndose más globulosos, con gran cantidad de eucromatina, quedando solo una tenue banda incompleta y más condensada a nivel de la carioteca, en la que se marcan los poros nucleares con claridad y con un nucleolo central muy llamativo. Las escotaduras son menos numerosas y profundas, que en los núcleos típicos de los miocitos que encontramos en la zona más ancha de la fibra.

En las proximidades de estos núcleos, aparece un citoplasma con un fondo homogéneo, en el que aumentan los polirribosomas y a veces puede apreciarse algunas cisternas de retículo endoplásmico rugoso y grandes acúmulos de mitocondrias perinucleares. Partiendo de la membrana, suelen verse con claridad unas invaginaciones profundas y rectilíneas (Figura 41 →), que se pierden y reaparecen, dirigiéndose a la zona del citoplasma que empieza a estar ocupada por las miofibrillas.

A nivel del tejido conjuntivo interfibrilar en la zona adyacente, se aprecia un aumento en el número y la dilatación de los capilares (Figura 40 *), con gran número de mitocondrias en sus citoplasmas y una activa micropinocitosis. Los fibroblastos (Figuras 40 F y 42 F) aumentan en número y sus núcleos presentan la heterocromatina muy condensada en masas periféricas y centrales, con imágenes redondeadas en su espesor, que podrían describirse como de aspecto vesiculoso, menos electrodenso, compatibles con la estructura de poros nucleares muy activos (Figura 42 →). Tienen unas prolongaciones muy visibles que se distribuyen en todos los campos de este tejido (Figuras 40 y 43) y el citoplasma contenido en ellas, presenta innumerables microvesículas. También es frecuente encontrar restos nucleares pequeños y muy electrodensos y material de forma irregular y amorfa entre los paquetes fibrilares, que invitan a interpretarlos como restos de células apoptóticas (Figura 40 y 42 *). En las proximidades encontramos con frecuencia linfocitos extravasados (Figura 40 L).

En las porciones de mayor anchura de la célula, encontramos también diferencias morfológicas entre unas y otras poblaciones de fibras musculares, predominando de forma manifiesta una de ellas, con características muy precisas y diferenciadas del resto. Estas fibras musculares aparecen también, como es obvio en los grupos control, pero en menor frecuencia y de menor tamaño.

Si analizamos la morfología de las miofibrillas en nuestro grupo problema (Figura 44), vemos cómo hay muchas imágenes de roturas en la zona media de las líneas Z, a modo de un ojal, que se extiende progresivamente hacia la línea M de cada sarcómera adyacente (Figura 44 * y 45). En muchos casos, la separación en dos bandas de estas miofibrillas, está más avanzada en un extremo que en el otro, dando la impresión de una bifurcación de la miofibrilla original (Figura 44 ★). La inserción de las miofibrillas a nivel de las líneas Z escindidas, es aparentemente normal en toda su extensión. En muy pocas ocasiones la rotura de la línea Z se produce en varias porciones y en estos casos, es una imagen más frecuente en la otra población celular, menos abundante en este grupo de ciclistas R21, pero mucho más en los velocistas, por lo que la describiremos en el apartado correspondiente a estos atletas.

El resto de características citoplásmicas de las fibras musculares predominantes en esta ocasión, se adapta a la que presentan las mismas células en el grupo control, pero aumentadas o disminuidas en tamaño o número, dependiendo de la organela que estudiemos o de su localización.

El RS, sus cisternas terminales y los túbulos T, son poco manifiestos por su pequeño calibre. En los cortes longitudinales pueden vislumbrarse como pequeñas vesículas en las proximidades de las líneas Z (Figura 44 →), pero no suele verse la estructura de las triadas. No aparecen cisternas a nivel de los ojales de separación de las líneas Z, hasta que esta separación abarca varias sarcómeras.

En el corte transversal, vemos mejor las imágenes redondeadas, similares a vesículas, alternando su tamaño, con mayor o menor calibre, en los vértices de los paquetes con forma poligonal irregular de las miofibrillas. El contenido de las cisternas es división, con algún punteado tenue y algo más denso en algunas ocasiones. Los túbulos T, se distinguen como delgadas estructuras membranosas en relación con las cisternas terminales del RS (Figura 46 →).

Entre estos pequeños grupos de cisternas, se aprecian con claridad una gran cantidad de mitocondrias de diversas formas y tamaños, dependiendo de su localización. En las intermiofibrilares en corte transversal, podemos verlas redondeadas y de gran tamaño en los vértices de los paquetes de miofibrillas (Figura 46 M), junto a otras de menor calibre y aplanadas, entre los lados rectos de estos mismos paquetes (Figura 46 m).

En el corte longitudinal también se encuentran claras diferencias de unas zonas a otras de las células. Entre algunos paquetes de miofibrillas, se localizan con forma elíptica a ambos lados de la línea Z, en las proximidades de las cisternas del RS (Figura 47 m). Pueden aparecer también con estas mismas características en los ojales de bifurcación para crecimiento transversal. En esta misma posición intermiofibrilar y perfectamente alineadas en un trayecto considerable, aparecen aglomeraciones de grandes mitocondrias (Figura 47 M), en relación con todas las bandas de miofibrillas contiguas.

También aumentan en número, aunque el tamaño no lo hace en la misma cuantía que las que acabamos de describir, las mitocondrias subsarcolémicas, muy frecuentes en esta población celular (Figura 48 *), de manera que a veces la superficie de la célula presenta una elevación a este nivel, dada la estructura más compacta del citoplasma, que en el grupo de los controles. En el caso de las perinucleares, el tamaño es similar

al de los mismos elementos celulares en los controles, aunque suelen aparecer en mayor número (Figura 49 *).

Si tenemos en cuenta el sustrato energético de reserva, que va a proporcionar los elementos necesarios para que las mitocondrias lleven a cabo su función, no podemos dejar de mencionar, por un lado el aumento de partículas de glucógeno que pueden verse en el hialoplasma intermiofibrilar (Figuras 45 → y 47 →), y por otro, las gotas lipídicas a distintos niveles, en directa relación con las mitocondrias y perfectamente distribuidos de forma alternante, en la zona de grandes bandas de mitocondrias entre los paquetes de miofibrillas (Figura 47 L). Aparecen como grandes gotas lipídicas, de tamaño regular y contenido con la misma escasa densidad electrónica. La segunda localización la encontramos en diversas zonas subsarcolémicas, con mayor frecuencia en las proximidades de los núcleos, y presentando una morfología similar, pero de menor tamaño.

El aspecto de los núcleos que encontramos en estas zonas más anchas de la célula, varían igual que en las localizaciones de crecimiento longitudinal. Desde las formas abigarradas de gran cantidad de heterocromatina y formas irregulares, hasta los globulosos con predominio de eucromatina y con nucleolos muy patentes (Figura 49 N). Estos núcleos, sobresalen en la superficie de la célula y se localizan frecuentemente en las zonas con más bifurcaciones de fibrillas.

A su lado, en un gran número de casos, encontramos células satélites, todavía alojadas en excavaciones de la fibra, aunque sobresalen más que las de la población control (Figura 50). A pesar del gran número de imágenes estudiadas, no hemos encontrado ninguna absolutamente clara y fiable, de comunicación entre los citoplasmas de las células satélites y los miocitos. Sin embargo, hay más puntos de aproximación y contacto entre las membranas, que en el caso de los controles (Figura 50 →). La lámina basal se mantiene íntegra, cubriendo por fuera las dos células.

El último dato a tener en cuenta es el aspecto del árbol vascular en estas zonas rectas entre dos fibras musculares. En primer lugar, suelen presentar un calibre algo menor que los capilares localizados en los extremos, con un endotelio de paredes muy finas y con un número moderado de mitocondrias en su citoplasma, así como vesículas de pinocitosis (Figura 51). En ocasiones, aparece un contenido lipídico en el citoplasma (Figura 51 L) con más frecuencia que en los atletas de velocidad. No parece que soporten fenómenos de compresión, al menos en momentos de reposo, y el conjuntivo adyacente es menos rico en componentes, que el que habíamos comentado anteriormente, en los extremos distales de la célula.

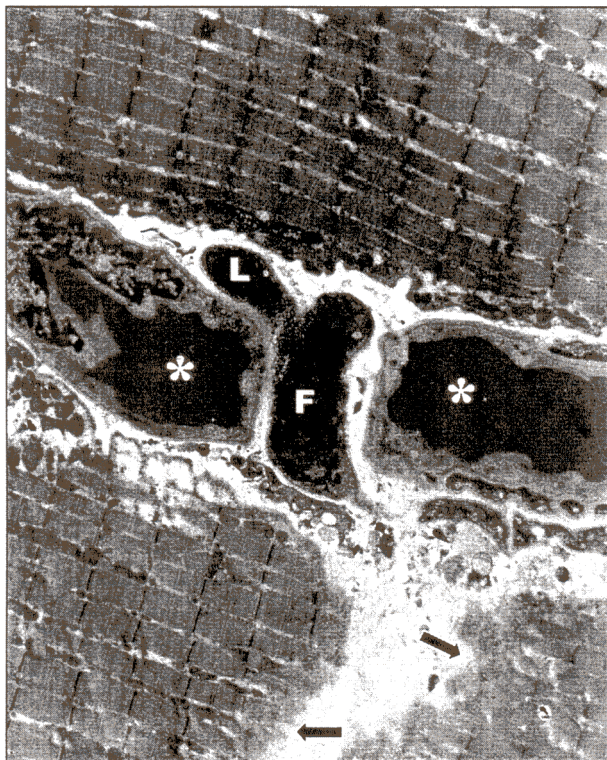


Figura 40.- Zona de crecimiento longitudinal de los extremos de dos células musculares. Sarcolema difuminado (→). Capilares dilatados (*), fibroblastos (F) y linfocitos (L) propios del tejido conjuntivo. R21. 2000x.

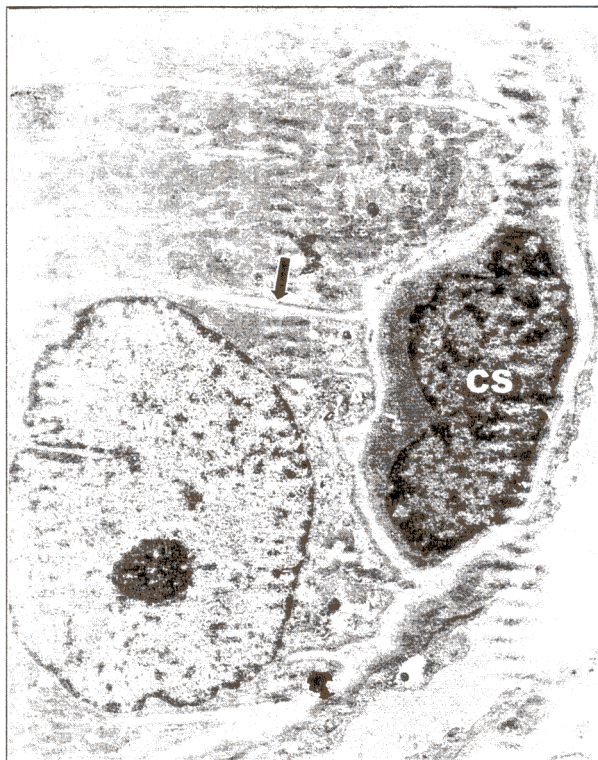


Figura 41.- Zona de crecimiento longitudinal de los extremos de dos células musculares. Núcleos de miocito (M) y célula satélite (CS), entre abundantes mitocondrias. Formación de túbulos T (→). R21. 3000x.

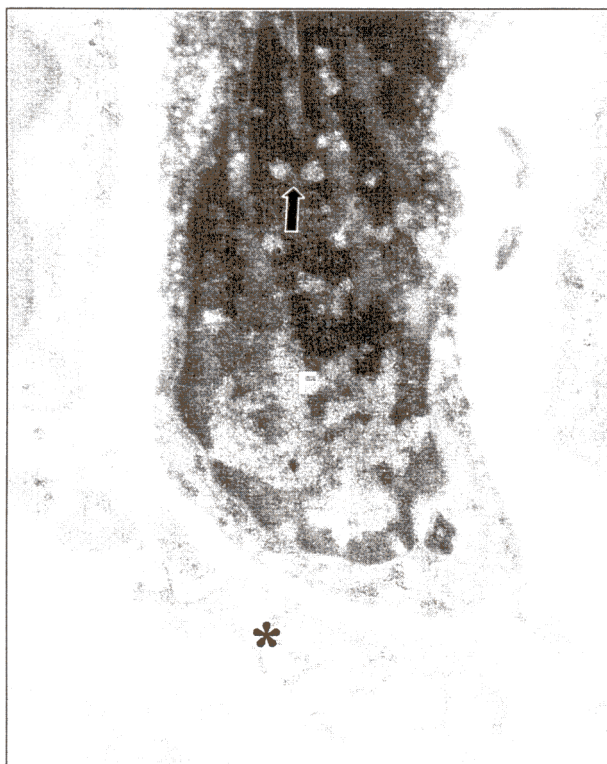


Figura 42.- Detalle del fibroblasto de la figura 40. Pueden verse poros nucleares activos (→). Sustancia fundamental con restos celulares (*). R21. 8000x.

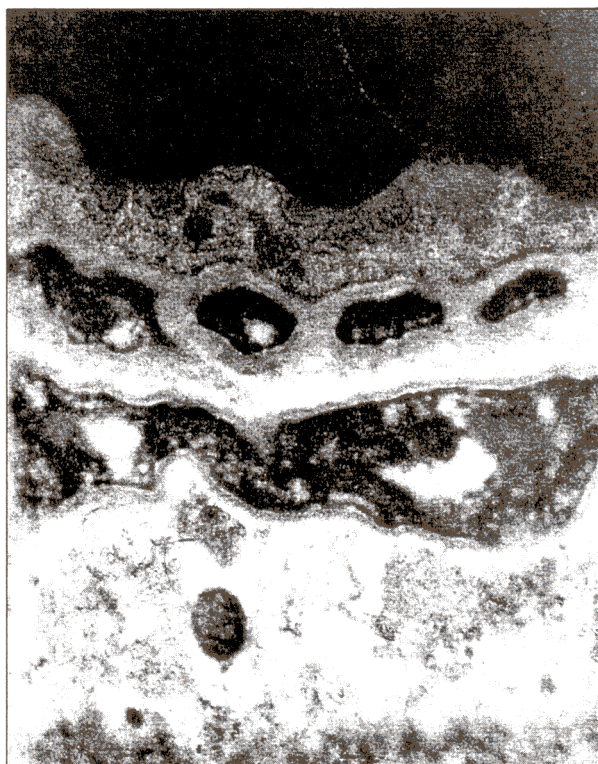


Figura 43.- Detalle del tejido conjuntivo de la figura 40. Prolongaciones de fibroblastos en corte longitudinal y transversal, estos últimos en las proximidades del endotelio capilar. R21. 8000x.

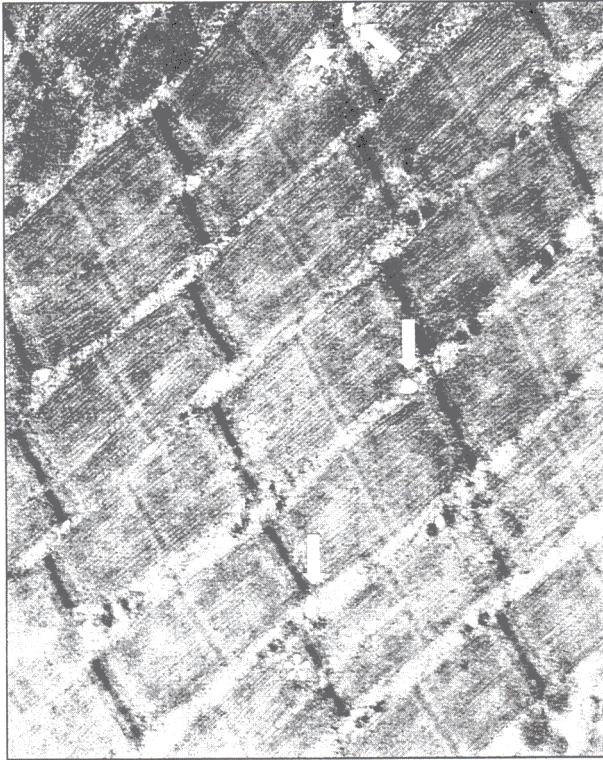


Figura 44.- Corte longitudinal de la célula muscular. Separación (*) y bifurcación (★) de miofibrillas para crecimiento transversal. Cisternas de RS (→). R21. 8000x.

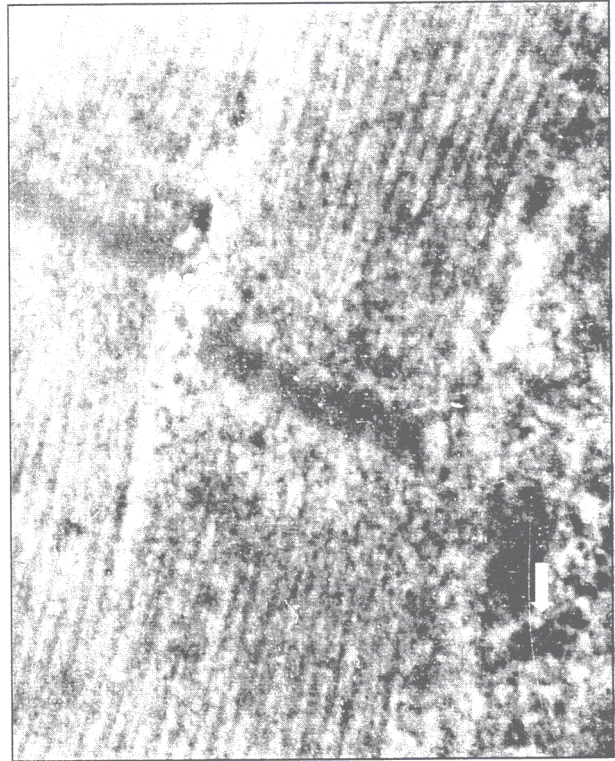


Figura 45.- Detalle del inicio de separación de dos miofibrillas en la línea Z, con su ojo de hialoplasma en la zona media (*). Rosetas de glucógeno (→). R21. 30000x.

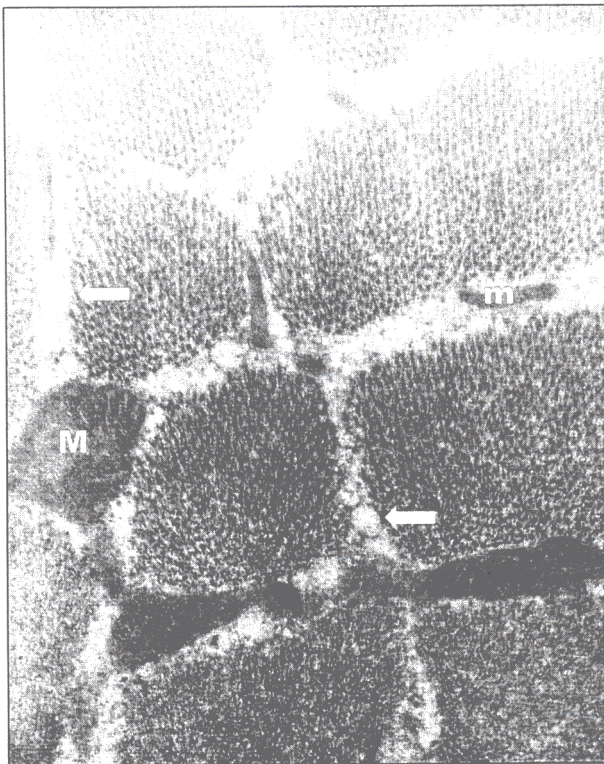


Figura 46.- Corte transversal de la célula muscular. Entre los paquetes de miofibrillas se distribuyen mitocondrias (M y m), cisternas de RS y estrechos túbulos T (→). R21. 20000x.

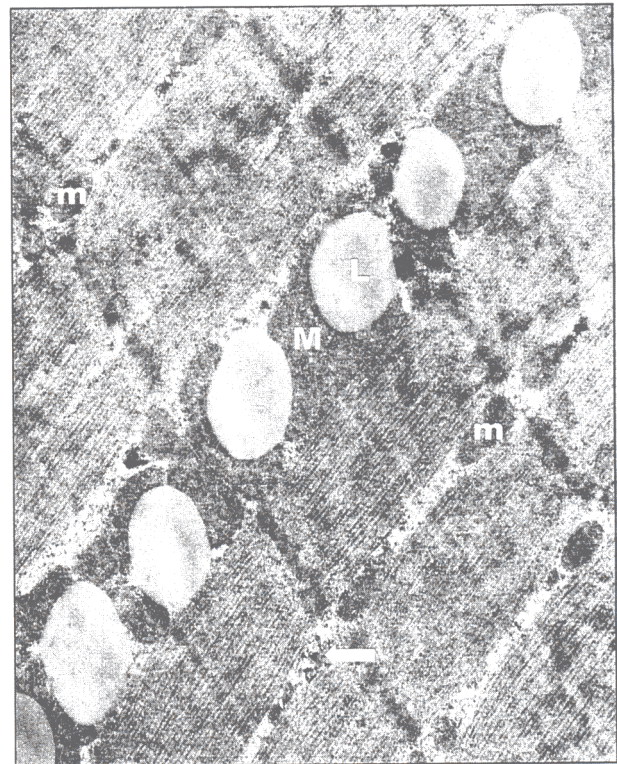


Figura 47.- Corte longitudinal de la zona media de una célula muscular. Se aprecia la distribución de mitocondrias (M y m), gotas lipídicas (L) y granos de glucógeno (→). R21. 12000x.

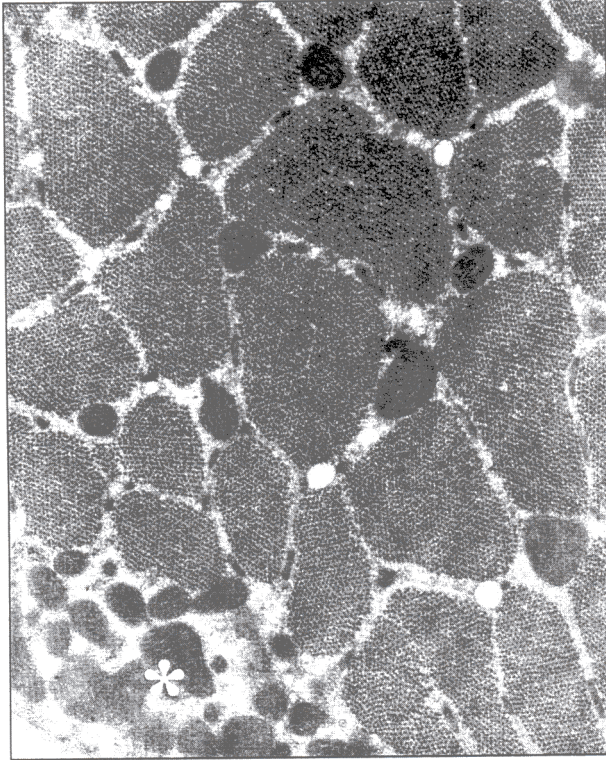


Figura 48.- Corte transversal de una célula muscular. Se aprecian las mitocondrias intermiofibrilares y la acumulación de las subsarcolémicas (*). R21. 8000x.



Figura 49.- Núcleo de aspecto mioblástico (N), de una célula muscular, con patente nucleolo y poros nucleares activos (→). Mitocondrias perinucleares (*). R21. 5000x

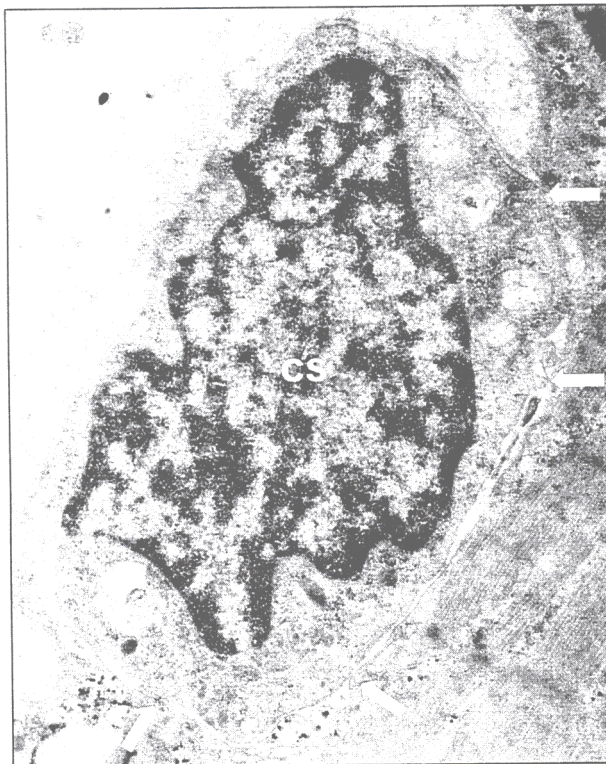


Figura 50.- Célula satélite (CS) alojada entre la lámina basal y el miocito, con zonas de contacto entre las membranas de ambas células (→). R21. 5000x.



Figura 51.- Capilar del endomisio (C) en cuyo citoplasma se aprecia algunas mitocondrias y gotas lipídicas (L). R21. 5000x.

11.2.- VARIACIONES EN LOS ATLETAS DE RESISTENCIA. GRUPO R25.

Los cortes que proceden del grupo de atletas de resistencia con mayor edad, muestran también una imagen panorámica compuesta por células de un tamaño similar entre ellas, pero con menor espacio intercelular que en el caso descrito anteriormente. Es decir, el corte es más compacto que el de los atletas del grupo R21 y de los grupos control.

Las figuras de crecimiento longitudinal en los extremos son mucho más abundantes, pero en estas porciones más estrechas de las fibras, aparecen imágenes abigarradas de contactos laterales entre los miocitos (Figuras 52 y 53), sobre todo los de tipo I, que ponen en serio compromiso el árbol vascular, disminuyendo además los espacios ocupados por el tejido conjuntivo (Figura 54 A y B).

Los núcleos de estos miocitos presentan un aspecto muy diferente de unos a otros en la misma zona, de forma que podemos ver algunos predominantemente eucromáticos y redondeados (Figura 52 N1), y otros con mayor concentración de heterocromatina y con profundas indentaciones que le dan un aspecto de pliegue en zigzag (Figura 52 N2). En ambos casos llama la atención nuevamente la aparición de pequeños espacios de aspecto vesiculoso en su cromatina, con predominio en una de las dos caras nucleares, en la vertiente citoplásmica o en la vertiente membranosa. Estas zonas menos electrodensas aparecen solo de forma aislada en los núcleos de las células endoteliales de la misma región. Cuando lo observamos a grandes aumentos y en las regiones en contacto con la carioteca, vemos que coinciden con poros nucleares, aparentemente funcionantes (Figura 55 *).

En las proximidades de estos núcleos se encuentran grandes concentraciones de mitocondrias perinucleares, que junto con ellos, hacen protusión en el tejido conjuntivo del endomisio (Figura 52 *), deformando y desviando el trayecto de los vasos y comprimiendo las prolongaciones de los fibroblastos (Figura 53 F). En zonas más estrechas de la fibra, donde los núcleos con su solidez interrumpen la continuidad de las miofibrillas, hay muchas roturas microfibrilares, que dejan expuestas nuevas zonas de crecimiento longitudinal y transversal (Figura 52 →).

Las células satélites en relación con esta localización no muestran diferencias con el grupo anterior. Así mismo, volvemos a encontrar la imagen de membranas difuminadas en la zona de contacto de las dos células, con mayor concentración de material granular y fibrilar en el de tejido conjuntivo adyacente (Figura 53 →).

El tejido conjuntivo próximo a estas localizaciones ya hemos dicho que aparece comprimido por el paquete muscular, con el calibre de los vasos deformado y en ocasiones, muchas formas celulares sanguíneas en su interior (Figuras 52 C, 53 C y 56). Su endotelio es más delgado que en el grupo R21 y presentan menos mitocondrias y vesículas de pinocitosis. Los fibroblastos se muestran como células muy activas de núcleos alargados y citoplasma con largas y densas prolongaciones, que rodean en parte a las células endoteliales. Es frecuente encontrar en ellos inclusiones lipídicas y mitocondrias hinchadas y con pérdida de las crestas (Figura 53 F). Las imágenes de restos celulares en apoptosis se hace más frecuente, afectando sobre todo a linfocitos extravasados (Figuras 52 L y 53 L). Es posible ver también en este grupo experimental, la presencia de células cebadas en el tejido (Figura 54 A).

La porción más ancha de las células, es similar a la equivalente descrita en el apartado anterior, pero mucho más homogénea en la distribución de zonas de crecimiento transversal. Es decir, hay menos figuras de bifurcación de las miofibrillas (Figura 57), excepto en las regiones próximas al inicio del estrechamiento y en ese caso, el ángulo se abre siempre hacia el extremo distal. Esporádicamente pueden encontrarse zonas de desaparición de alguna línea Z, con falta de inserción de sus miofilamentos (Figura 58 ★) y, en esa misma localización, podemos ver grupos de pequeñas partículas muy electrodensas, que habitualmente no se aprecian más que en algún momento en el hialoplasma intermiofibrilar.

Las cisternas de RS y los túbulos T, no varían en comparación con el grupo anterior de atletas de resistencia con menor tiempo de entrenamiento. En los cortes longitudinales se localizan las vesículas redondeadas del RS y a ambos lados de la línea Z (Figura 57 →), pero no suele visualizarse con facilidad la estructura del túbulo T. En los cortes transversales, los espacios de hialoplasma son menores que en los R21, estando la mayor parte del citoplasma ocupado por las miofibrillas y las grandes mitocondrias, por lo que estas estructuras vacuoladas no presentan la misma amplitud en la luz central, sino que al adaptarse a los espacios residuales, van deformando su luz (Figura 59 →). Aun así, puesto que el aumento de tamaño de la célula al corte transversal es debido a un incremento en el número de miofibrillas, la cantidad de organelas implicadas directamente en la contracción, también debe aumentar.

El condrioma sigue en la misma línea, creciendo en el número y tamaño de sus elementos. Son más grandes las mitocondrias intermiofibrilares (Figura 58 M), y más frecuentes las figuras de componentes llamativos dispuestos en hilera (Figura 57 *). Además de estas formas lineales que ya veíamos en los otros atletas de resistencia con

tres años de entrenamiento, observamos la presencia de verdaderos acúmulos similares a los subsarcolémicos, en medio del espesor del hialoplasma (Figura 57 ★), y entre estas figuras muy electrodensas, se conservan estructuras vesiculosas con la luz homogénea y redondeada similar a la que se aprecia integrando el RS (Figura 57 →).

Los acúmulos mitocondriales subsarcolémicos aumentan y aparecen más extendidos y homogéneos, por debajo de la membrana plasmática (Figura 62). En la zona perinuclear también aumentan en número y llegan a constituir, junto con el núcleo, grandes protusiones que sobresalen en la superficie de la célula (Figura 63 * y ★).

La cantidad de glucógeno interfibrilar es similar al del grupo anterior. Las gotas lipídicas también son llamativas en este estadio, aumentando en tamaño y en la densidad de su contenido, hasta el punto de que en la zona de mitocondrias en hilera, tienden a deformarlas y aplanarlas. También se ve una inclinación a fusionarse en estas formaciones lipídicas (Figura 58 L), disminuyendo de esta forma su superficie de contacto con el medio que los rodea. En zonas próximas a la membrana, entre los acúmulos mitocondriales, se reúnen grupos de gotas de distinto tamaño y densidad, que parecen contenidas en una estructura membranosa de aspecto lisosómico, por lo que se pueden considerar restos degenerativos (Figura 62 L).

Los mionúcleos en esta localización, van perdiendo la tendencia a presentar el aspecto globuloso (Figura 60 N1), que caracterizaba las zonas con mayor cantidad de bifurcaciones, con tendencia a condensar más su cromatina (Figuras 60 N2 y 63 N), a la vez que disminuye el número de nucleolos visibles, pero siguen teniendo una gran cantidad de complejos de poro en aparente funcionamiento (Figuras 63 N y 55 B). Las cisternas de retículo endoplásmico rugoso perinucleares siguen estando presentes, pero su luz ha disminuido bastante.

Sus relaciones con las células satélites son similares a las que se establecen en el resto de los grupos que hemos valorado. Se ven con menos frecuencia que en el estadio anterior, pero siguen localizándose en las proximidades de otros núcleos de miocitos. Generalmente hacen protusión en la superficie de la fibra muscular, cubierta por la lámina basal de ésta, y otras veces mantiene su localización en la excavación correspondiente (Figura 61). En este grupo siguen sin verse comunicaciones citoplásmicas en el lecho de la célula, pero sí hemos llegado a ver contactos estrechos entre ambas células, con aproximación de las dos membranas y depósito de material electrodenso entre ellas, con una zona intracitoplásmica más densa en ambas células (Figura 61 *). En otras zonas, aparecen a nivel del contacto unas estructuras de

aspecto vesiculoso que serían superponibles a uniones de tipo comunicante (Figura 61 →). Aun así están muy lejos de ser fenómenos de fusión de membranas. Lo más cercano a la integración de una célula satélite a un miocito, podemos verlo en la figura 63, en la que solo en la zona limítrofe del citoplasma perinuclear con el acúmulo mitocondrial sarcoplásmico, hay una doble membrana, pero por su calibre y trayecto, podría tratarse también de un túbulo T (Figura 63 →).

El contenido en capilares de estas zonas laterales de las células es más abundante que en el estadio anterior (Figuras 60 C y 64 C) y con el calibre comprometido en muchos casos por la compresión del tejido muscular hipertrófico. Mayor también es la densidad del tejido conjuntivo interfibrilar (Figuras 64 * y 63 *), porque el espacio para alojarse disminuye al aumentar el tamaño de las células musculares.

Los núcleos de los fibroblastos (Figuras 60 F y 63 F) son muy alargados y sus densos citoplasmas emiten finísimas prolongaciones que alcanzan distancias considerables. Las mitocondrias siguen presentando lesiones vacuolares y pérdida de crestas (Figura 69 →). Entre las poblaciones propias de las células móviles del tejido conjuntivo, encontramos mayor cantidad de linfocitos extravasculares (Figura 60 L) y mayor llegada y alojamiento de monocitos (Figura 56 M). En ocasiones también encontramos células cebadas, sobre todo en las zonas donde hay más compromiso vascular (Figura 55 A).

En este grupo de atletas puede verse además de las células descritas, con mayor frecuencia que en los otros grupos, aunque en muy escaso número, otra población de células musculares de características especiales, que también han aumentado de tamaño, en comparación con el grupo control. Su zona de crecimiento longitudinal es igual que las hemos descrito en este apartado, pero con roturas en las líneas Z (Figura 65 *) y bifurcaciones (Figura 65 →), que aparecen en proporción similar, en sus miofibrillas. Sus núcleos son similares a los que hemos descrito como forma más frecuente en el grupo R21, pero tienen menor concentración de células satélites. Las mitocondrias son grandes y de formas caprichosas, distribuyéndose en largas hileras de un elemento en las regiones subsarcolémicas (Figura 65 M) y en acúmulos más pequeños en las zonas perinucleares y entre las miofibrillas (Figura 65 m). En el corte transversal se observa su forma aplanada (Figura 66 M) y. El RS empieza a ser más llamativo y se puede ver con claridad, sobre todo en cortes transversales (Figura 66 * y →). La cantidad de glucógeno que almacenan es moderada y se ven muy pocas gotas lipídicas.

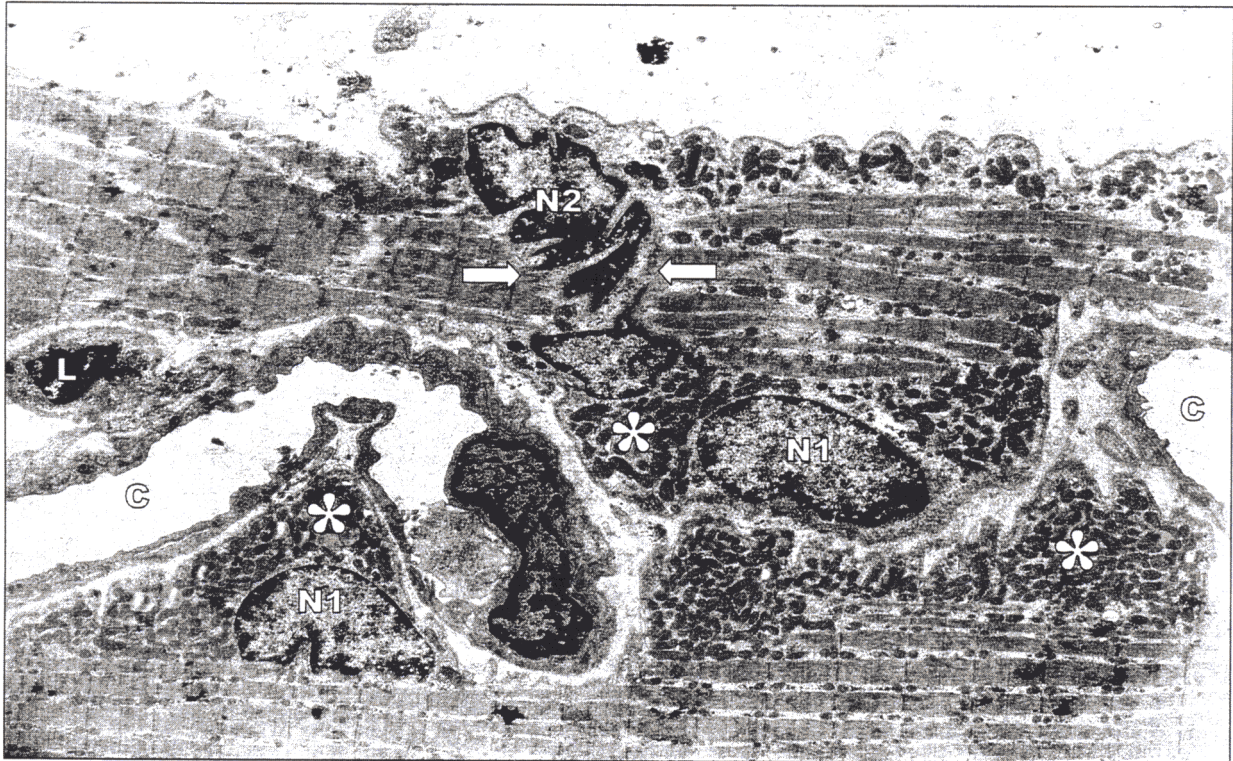


Figura 52.- Corte de la porción de crecimiento longitudinal de dos células musculares, con núcleos de miocitos globulosos (N1) y heterocromático (N2). Acúmulos de mitocondrias perinucleares (*). Tejido conjuntivo con capilares abundantes (C) y linfocitos en apoptosis (L). R25. 2500x.

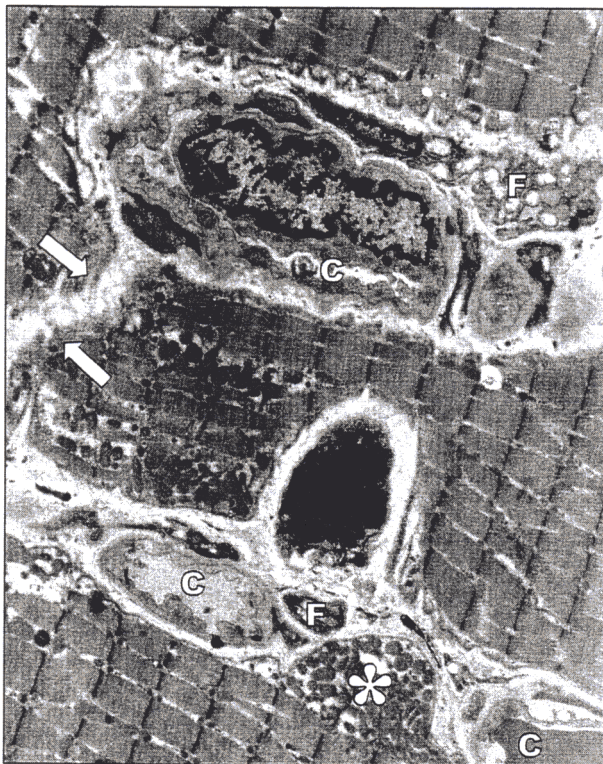


Figura 53.- Zona de crecimiento termino-terminal de dos miocitos (→). Acúmulo de mitocondrias subsarcolémicas (*). Fenómenos de compresión en tejido conjuntivo, con abundantes capilares (C) y fibroblastos (F). R25. 2000x.

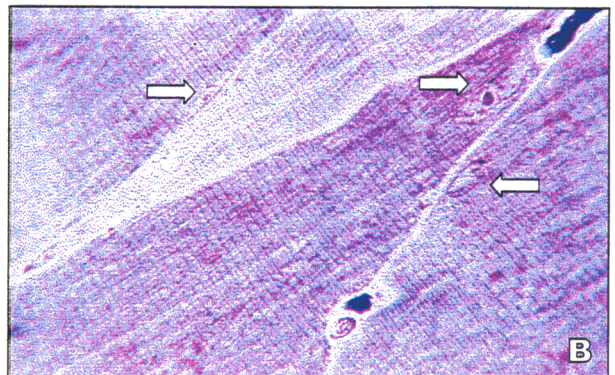
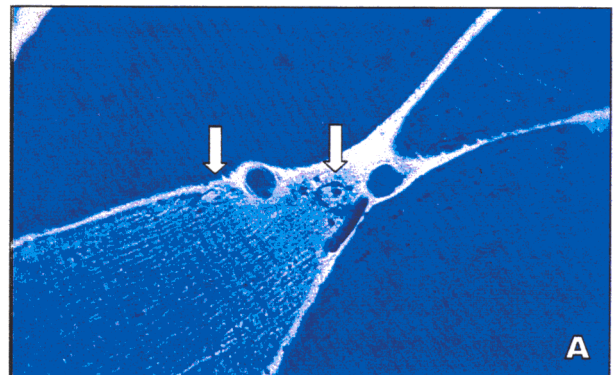


Figura 54 A y B.- Extremos de crecimiento longitudinal de fibras musculares en atletas de resistencia. Núcleos terminales y laterales (→). R25. Cortes semifinos. 200x.

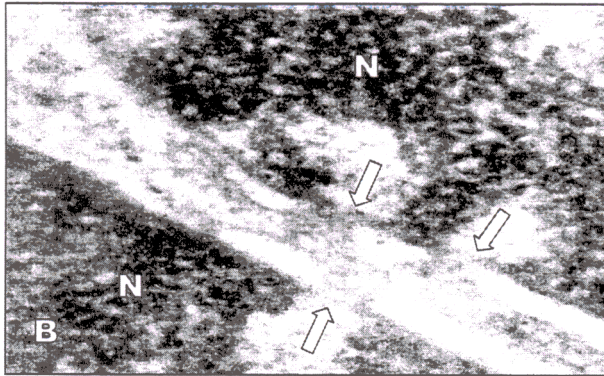
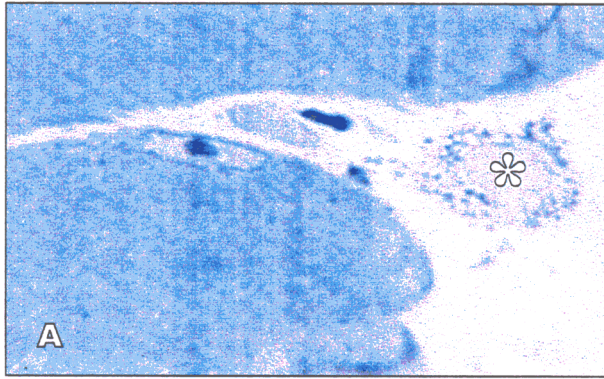


Figura 55 A.- Célula cebada (*) en el espacio intercelular de dos miocitos. R25. Corte semifino. 300x. **55 B.-** Detalle del núcleo (N) de un miocito. Zona libre de cromatina a nivel de los poros nucleares. R25. 85000x.



Figura 56.- Capilar del tejido conjuntivo interfibrilar (E), conteniendo un monocito (M). R25. 6000x.

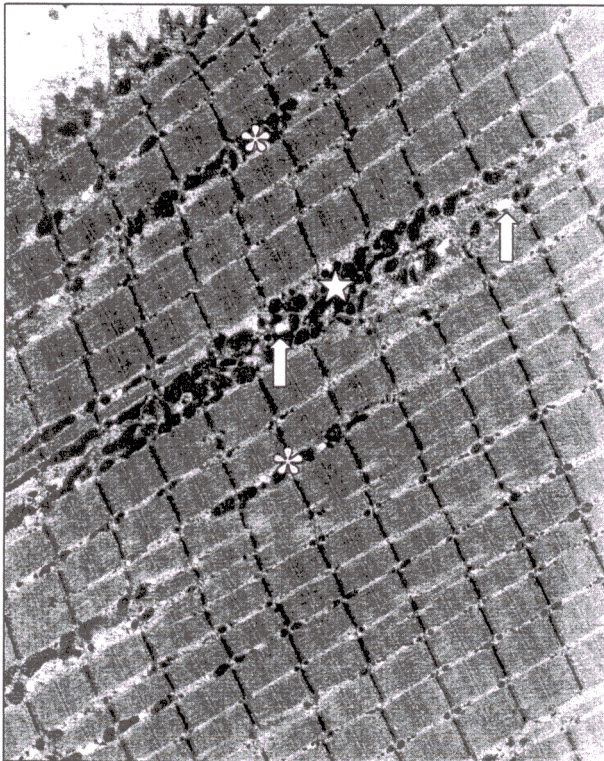


Figura 57.- Corte longitudinal de una célula muscular. Distribución intermiofibrilar de mitocondrias en hileras (*) y en acúmulos (*). Cisternas de RS en varias localizaciones (→). R25. 3000x.

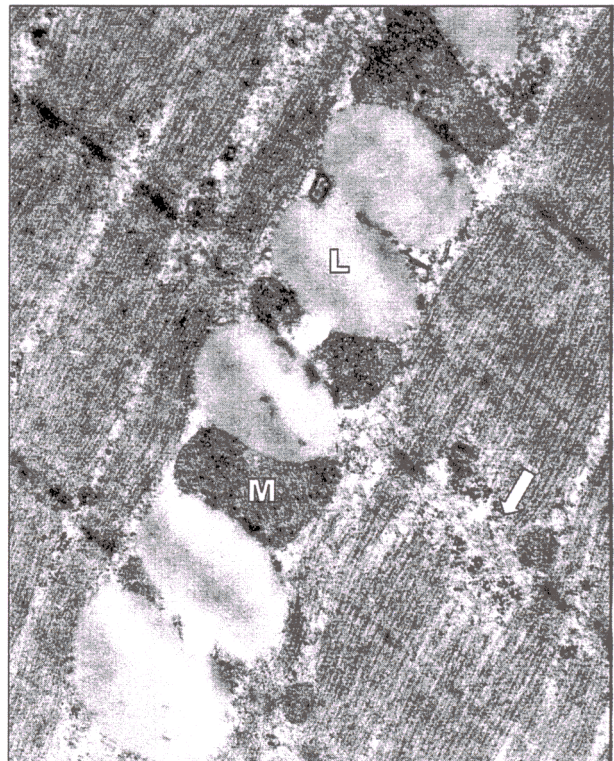


Figura 58.- Corte longitudinal de miofibrillas con alternancia de grandes mitocondrias en hilera (M) y gotas lipídicas (L). Roturas esporádicas en línea Z (→). R25. 12000x.

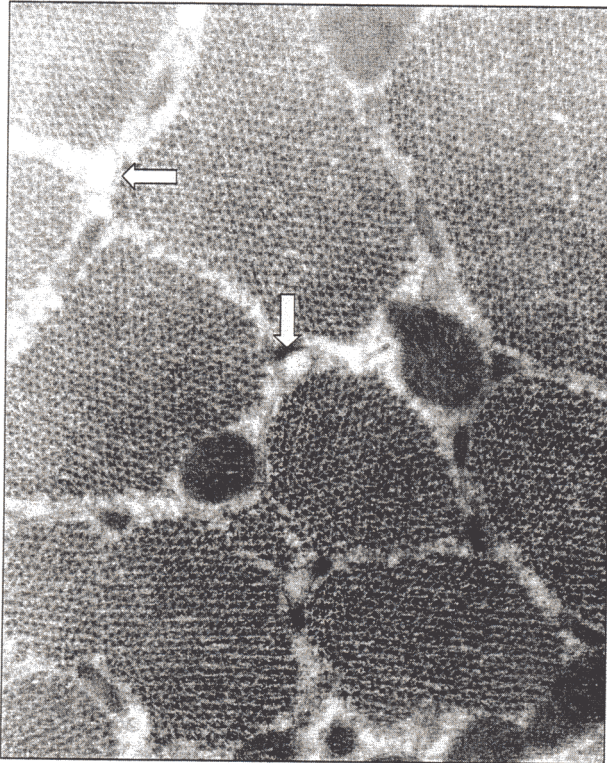


Figura 59.- Corte transversal de un miocito con reducción de espacio para alojamiento de cisternas de RS (→) por el mayor tamaño de las miofibrillas. R25. 20000x.



Figura 60.- Miocitos y espacio intersticial de ambos. Núcleos de miocitos con distinto aspecto (N1-N2). Conjuntivo rico en vasos (C) y poblaciones celulares propias: fibroblasto (F) y linfocito (L). R25. 4000x.



Figura 61.- Célula satélite alojada alojada en una excavación del miocito. Densificación de la membrana en la zona de aproximación (*). Zona de posible contacto estrecho entre ambas células (→). R25. 14000x.

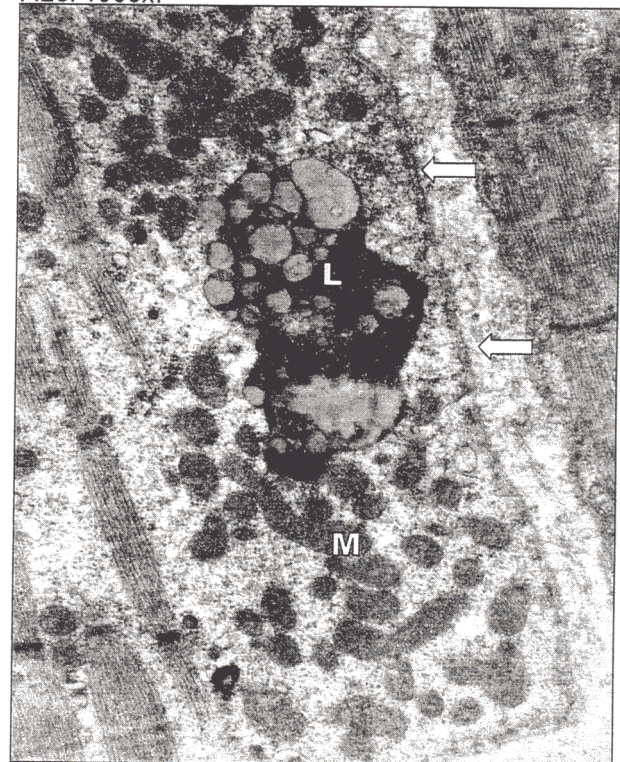


Figura 62.- Zona subsarcolémica de un miocito con abundante acumulación de mitocondrias (M) y cuerpo residual de contenido heterogéneo, con gotas lipídicas (L). Sarcolema manifestado (→). R25. 8000x.

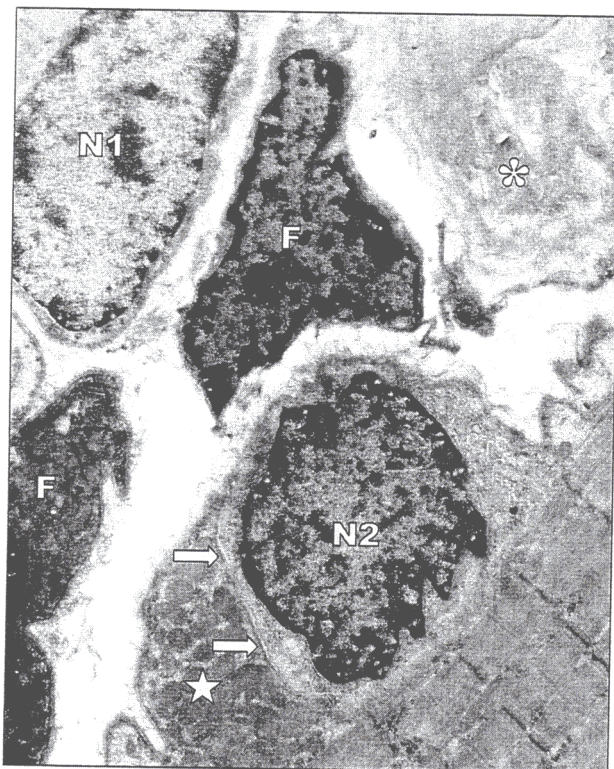


Figura 63.- Tejido conjuntivo intercelular, con mayor cantidad de sustancia fundamental (*) y celularidad (F). Núcleos de miocitos de diferentes aspectos (N1-N2). Mitocondrias perinucleares (★) y nacimiento de túbulo T (→). R25. 5000x.



Figura 64.- Capilares (C) del espacio intersticial con calibre disminuido y gran cantidad de sustancia fundamental y fibras a su alrededor (*). R25. 5000x.

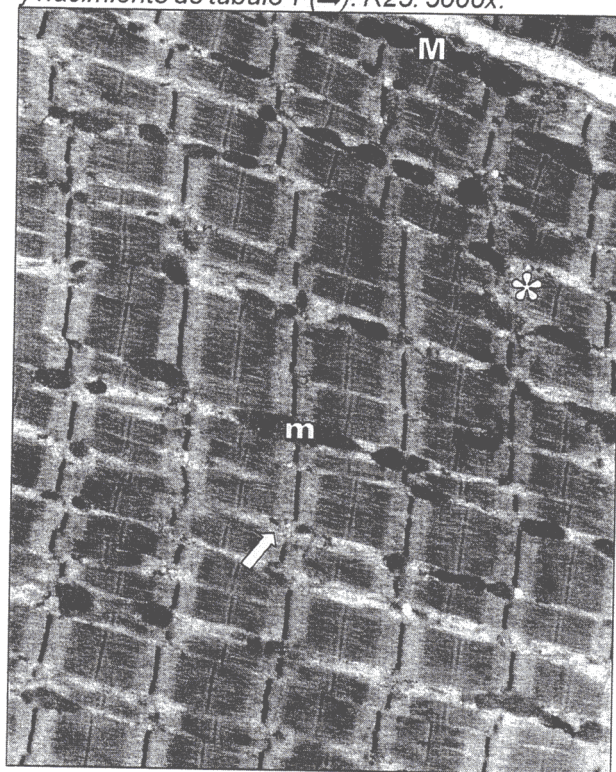


Figura 65.- Corte longitudinal de miocito con mitocondrias distribuidas en hilera en todas las regiones (M y m). Roturas de línea Z (*) y bifurcaciones de miofibrillas (→). R25. 5000x.

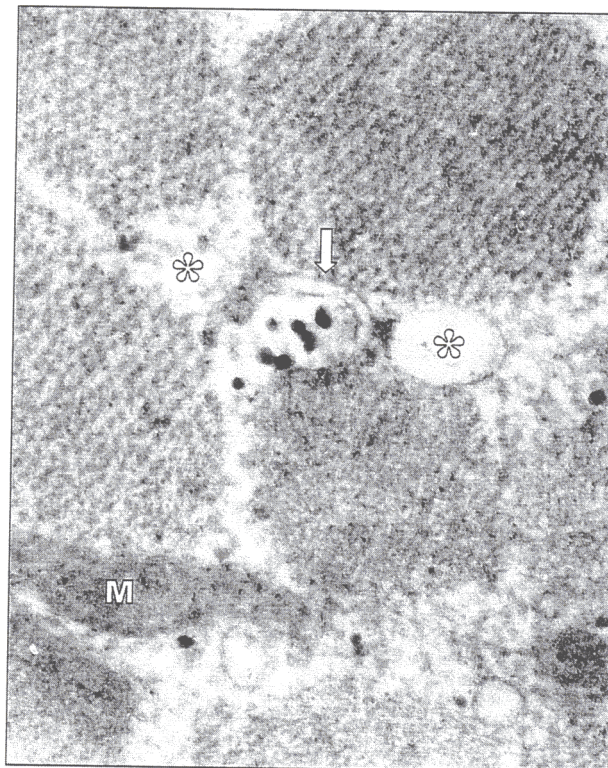


Figura 66.- Corte transversal a gran aumento de un miocito similar al de la anterior figura. Es sistema de túbulos T (→) y cisternas de RS (*) se aprecian con claridad, entre los paquetes de miofibrillas y las mitocondrias (M). R25. 50000x.

11.3.- VARIACIONES EN LOS ATLETAS DE VELOCIDAD. GRUPO V21.

En este grupo de atletas, la fibra muscular predominante difiere de las que hemos descrito hasta ahora, no solo desde el punto de vista funcional, como veremos más adelante, sino también en su base morfológica ultraestructural. Las formas citológicas que hemos descrito como predominantes para R21 y R25, pensamos que corresponde a las tipo I y IIc, y también aparecen en este grupo de velocistas de carrera, pero en mucha menor proporción y en menor tamaño que en el grupo control. Sin embargo, en este caso la mayor frecuencia corresponde a la otra población celular, que disminuía lentamente en el entrenamiento para resistencia y que creemos que corresponde a las fibras musculares tipo IIa y IIb.

Las zonas de crecimiento longitudinal de estas fibras musculares en sus extremos afilados, presentan una acumulación de núcleos con distinta configuración desde los clásicos con indentaciones en la porción que comienza a disminuir de calibre, hasta los de eucromatina dominante, con aspecto mioblástico, en las zonas próximas a los extremos (Figuras 67 N y 68A →).

En las cercanías de los núcleos con cromatina más laxa, suelen alojarse células satélites, debajo de la lámina basal (Figura 67 CS). A microscopía electrónica no se aprecian claras diferencias en su aspecto, que indiquen un cambio funcional. Presentan núcleos redondeados o facetados, con cromatina pegada a la carioteca y alguna vez indentaciones no muy marcadas. En algunos casos existen zonas de contacto entre su citoplasma y el de la célula muscular, que hacen pensar en una posible continuidad, porque no son visibles las membranas de ambas células en toda su extensión. Es más frecuente en zonas próximas a un núcleo de miocito de aspecto laxo. Todos los núcleos muestran las pequeñas porciones redondeadas no electrodensas, que ya habíamos descrito como zonas de ubicación de poros nucleares.

En esta localización, las mitocondrias aparecen también en zona subsarcolémica (Figura 67 *), pero casi nunca en grandes acúmulos, sino más bien alineadas bajo la membrana y con alguna concentración perinuclear más abundante. Entre las miofibrillas siguen estando de forma constante, en las células que presentan el acúmulo subsarcolémico en mayor cantidad (Figura 69 *), pero no son tan abundantes como en los atletas de resistencia. La mayoría de ellas se pueden localizar como una pequeña hilera entre los paquetes de miofibrillas de los extremos de crecimiento longitudinal (Figura 67 m).

Esta región de gran actividad, difiere del resto de la célula en la mayor cantidad de mitocondrias intermiofibrilares, sobre todo en relación a zonas de rotura de las miofibrillas (Figura 68 M), que a veces se produce a varios niveles de la misma sarcómera (F67 → y 68 B). En estos casos, al lado de las mitocondrias podemos encontrar gotas lipídicas (Figura 68 B L).

El tejido conjuntivo en relación con las zonas de crecimiento longitudinal, presenta un espacio más reducido que en los estudiantes del grupo control, pero, aunque pueden aparecer capilares (Figura 70 C) con formas alargadas en el corte oblicuo para adaptarse al espacio existente, no sufren en su trayecto las aparatosas modificaciones que veíamos en los deportistas de resistencia, manteniendo además un calibre normal. Las células propias del tejido, en esta localización, no son tan variadas como en los casos anteriores, predominando sobre todo los fibroblastos, con su estructura típica y citoplasmas repletos de organelas (Figura 69 F).

En el espesor del parénquima y con las fibras cortadas longitudinalmente, podemos ver los característicos paquetes de miofibrillas en haces paralelos y con las líneas Z alineadas en sus regiones más estables. Pero hay zonas en las que estas líneas están interrumpidas y divididas en pequeñas porciones, siempre en lugares próximos a desflecamientos de los miofilamentos, de forma que se pierde la estructura regular (Figuras 71 * y 72 *). Entre estas pequeñas fracciones electrodensas que constituyen las líneas Z interrumpidas, podemos constatar la presencia de hialoplasma, que va separando los fragmentos unidos originariamente.

No se ven roturas en la línea M, es decir, la zona A puede fragmentarse también en las miofibrillas que presentan escisiones en la línea Z, pero nunca a nivel de la línea M, de forma que queda la sarcómera dividida en dos partes asimétricas: una más pequeña sin línea M y otra mayor, que contiene la zona H y la línea M de la sarcómera original (Figura 74 →). Parece que a partir de estas líneas Z que no presentarían una contracción eficaz, pueden alinearse nuevamente los filamentos.

En algunos casos se ve que falta ya un alineamiento de la sarcómera rota, de forma que un paquete de miofilamentos se va orientando hacia otros adyacentes de las mismas características, aunque hay porciones de hialoplasma y organelas como mitocondrias y cisternas de RS en su trayecto, que modifican o enlentecen el proceso (Figura 74). En las imágenes estáticas no podemos saber si estas fibras se están alejando o aproximando pero se podrán plantear y analizar ambas hipótesis.

En otros campos las miofibrillas tienen líneas Z completas y microfilamentos insertados a cada lado, cerca de otras en las que la inserción de microfilamentos de uno de los lados aparece muy dudoso, con zonas poco electrodensas y un punteado que no sugiere proteínas organizadas en forma fibrilar (Figura 74 ★).

Si estudiamos a mayor aumento una de las líneas Z que se ha roto, vemos que presenta varias zonas perfectamente delimitadas: una porción estable muy electrodensa, con miofibrillas bien alineadas y ancladas a ambos lados, con sus bandas I y A completas y zona H con línea M ancha y marcada (Figura 73 A).

Una porción contigua, del mismo tamaño aproximadamente, algo menos electrodensa y con solo algunas miofibrillas fijas en ella. En la zona I de esta porción, vemos un material finamente granular, con distinta densidad electrónica entre los diferentes gránulos, entre otras estructuras filamentosas, que se disponen perpendiculares a la línea Z poco densa (Figura 73 B).

Al lado de esta zona, una tercera porción en la que no se distingue línea Z en el concepto clásico descrito, sino solo tres o cuatro estructuras muy finas de aspecto filamentoso dispuestas paralelamente y siguiendo la misma dirección de la línea, en las que parecen apoyarse pequeños puntos muy electrodensos, con aumento de polirribosomas en las proximidades. En esta región no se insertan miofilamentos, que se van aproximando, interrumpiéndose en las cercanías (Figura 73 C).

A nivel de la zona H, las miofibrillas que tienen inserción, aunque sea irregular, en la línea Z, presentan también línea M, pero ésta aparece muy difuminada y casi no se aprecia en la tercera porción (Figura 73 →).

El RS y el sistema de túbulos T, no tienen una morfología muy manifiesta en este grupo experimental, encontrando vesículas de pequeño tamaño a nivel de la línea Z, en aquellas que presentan su morfología normal (Figura 73 →), y sacos más dilatados en las zonas de rotura de éstas y de crecimiento de las miofibrillas (Figura 74 *). En el corte transversal quedan igualmente enmascarados (Figura 75 →), por la densidad que alcanzan las miofibrillas y la cantidad de glucógeno del hialoplasma.

Las mitocondrias en estas porciones medias de las células, son mucho menos numerosas, que en las fibras musculares predominantes en el grupo de atletas de resistencia y más regularmente repartidas, a ambos lados de la línea Z (Figuras 71 M y 73 M). También aparecen de mayor tamaño, interpuestas en las zonas de rotura de las miofibrillas (Figura 74 M). En raras ocasiones puede localizarse un pequeño

alineamiento subsarcolémico (Figura 78 →) y los acúmulos perinucleares son más importantes cuando acompañan a los núcleos de aspecto mioblástico (Figura 77 *).

El sustrato metabólico compuesto por el glucógeno, varía de unas células a otras con facilidad, pero en general parece de distribución más uniforme en este tipo de fibra muscular predominante, que en la tipo I de los atletas de resistencia, y bastante mayor que en la población control (Figuras 74 G y 75 ★). Las gotas lipídicas son mucho menos numerosas que en los grupos anteriores, pero siguen siendo similares las localizaciones (Figuras 77 L).

Los núcleos de esta porción media de los miocitos, que como en todos los casos anteriores se localizan en la perifería de la célula, también presentan formas variadas, desde los de aspecto globuloso (Figura 77 N), hasta los que sufren más los fenómenos de compresión por las miofibrillas al contraerse y muestran múltiples indentaciones en su estructura (Figura 76). Estos últimos, como en los casos anteriores, tienen más heterocromatina en su interior.

Las células satélites en esta porción de la célula, suelen localizarse en las inmediaciones del núcleo miocítico (Figura 77 CS). Entre las membranas de las dos células, pueden aparecer tanto aproximaciones, como separaciones, e incluso con acúmulo de material fibrilar poco electrodensó (Figura 77 ★), y en el caso que mostramos, nacimiento de túbulos T que se dirigen perpendicularmente a las miofibrillas más próximas (Figura 77 →).

Los capilares (Figura 78 C) que aparecen entre las paredes laterales de la porción media de los miocitos, están comprimidos por ellos, pero esta deformación en sus paredes, se recupera aparentemente en el momento de tránsito de elementos celulares en la luz del vaso, a expensas de la retracción de la fibra muscular a ese nivel (Figura 78 *). La población de células conjuntivas de estos espacios, es poco abundante, predominando fundamentalmente los fibroblastos de actividad moderada.

Entre estas fibras muy abundantes, que suponemos de tipo II por sus características morfológicas y su alta frecuencia en este grupo de deportistas, aparecen otras menos numerosas y más estrechas, en las que predominan las roturas en el punto medio de la línea Z dando la impresión de una bifurcación en las nuevas fibrillas formadas, que al avanzar las separa longitudinalmente. Entre estas miofibrillas aparecen acúmulos mayores de mitocondrias e incluso gotas lipídicas, por lo que pensamos que se pueden clasificar como fibras tipo I.

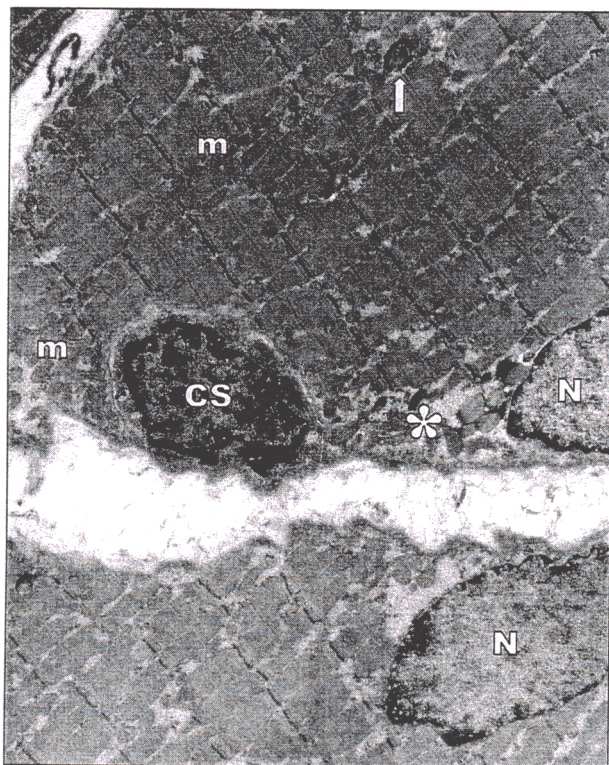


Figura 67.- Extremo de un miocito en corte longitudinal. Núcleos (N) y célula satélite (CS). Roturas para crecimiento (→) y acúmulo de mitocondrias entre fibrillas (m) o bajo el sarcolema (*). V21. 3000x.

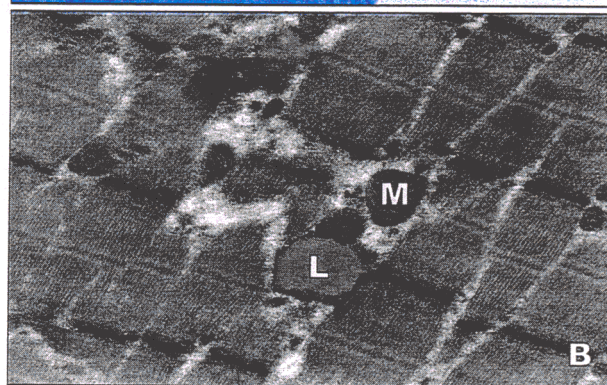
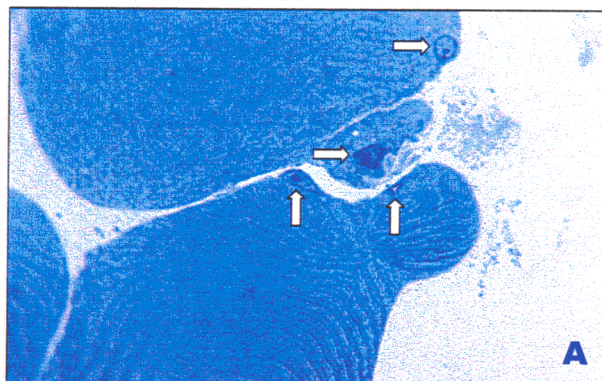


Figura 68 A.- Zona de crecimiento de aspecto romo de dos miocitos. Núcleos (→). Corte semifino. 400x.
68 B.- Rotura de miofibrillas con mitocondrias (M) y lípidos (L) interpuestos. V21. 6000x.

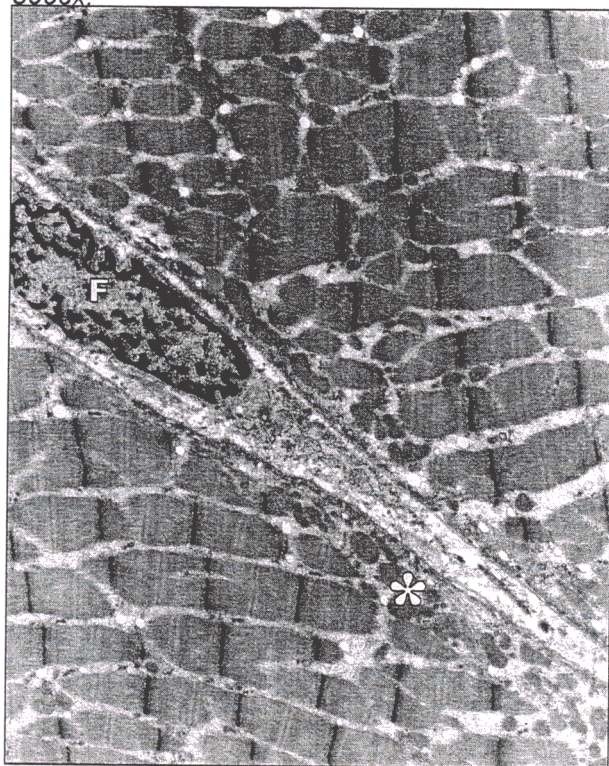


Figura 69.- Fibroblasto (F) entre dos células musculares, en su extremo de crecimiento distal. Mitocondrias subsarcolémicas (*). V21. 5000x..

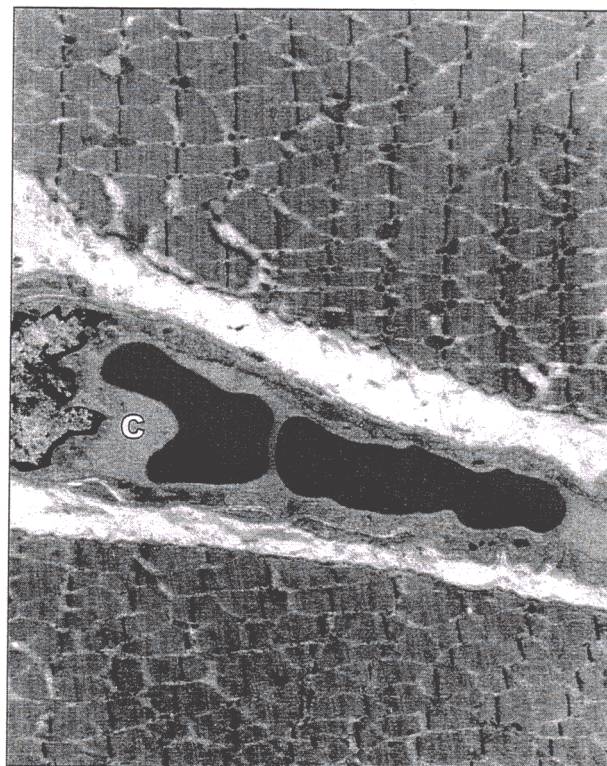


Figura 70.- Capilar intersticial (C) entre dos células musculares en las proximidades de la zona de crecimiento longitudinal. V21. 2000x.

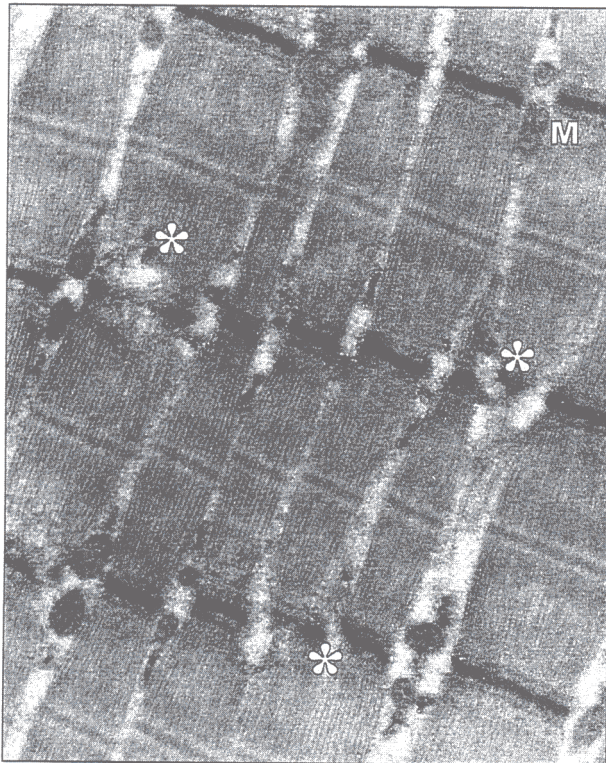


Figura 71.- Corte longitudinal de la zona media de una célula muscular con roturas en línea Z (*). Mitocondrias intermiofibrilares (M). V21. 10000x.

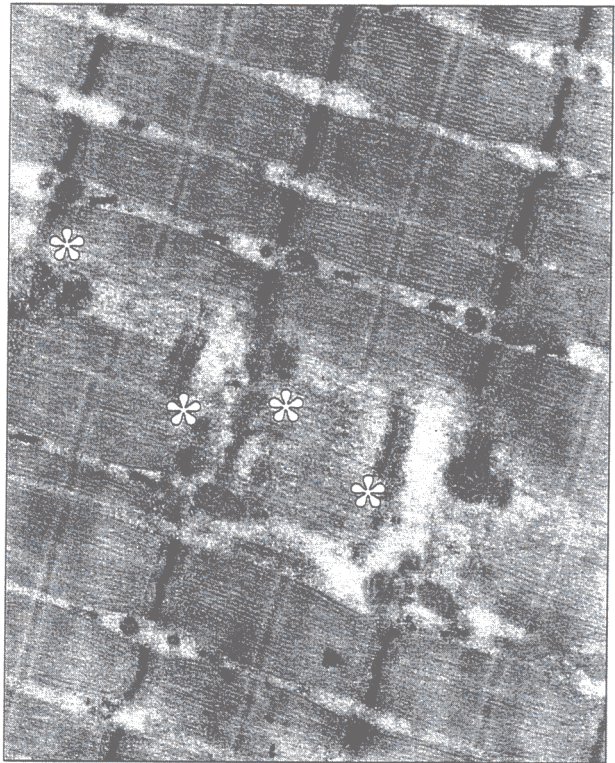


Figura 72.- Rotura de líneas Z de los haces de miofibrillas (*) entre otros haces íntegros. V21. 8000x.

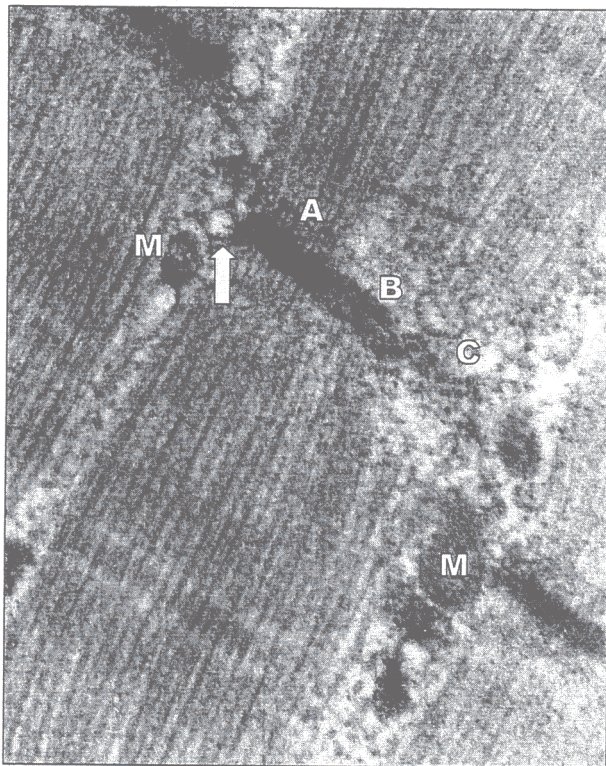


Figura 73.- Línea Z con electrodensidades diferentes (A, B y C), que se acompañan de diferente forma de inserción de las miofibrillas. Mitocondrias (M) y cisternas de RS (→). V21. 35000x.

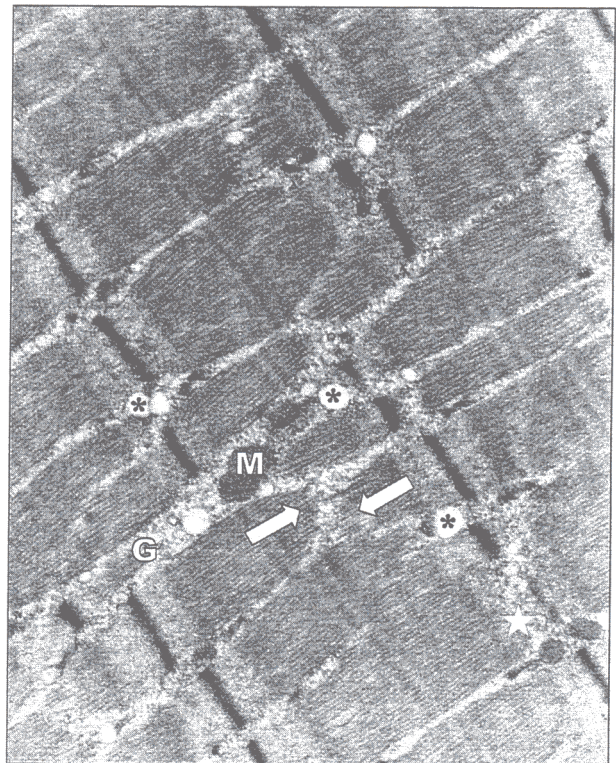


Figura 74.- Sección longitudinal de fibra muscular con rotura asimétrica de miofibrillas (→) y defectos de inserción (★). Mayor dilatación de cisternas de RS (*) y glucógeno (G) en el hialoplasma. V21. 8000x.

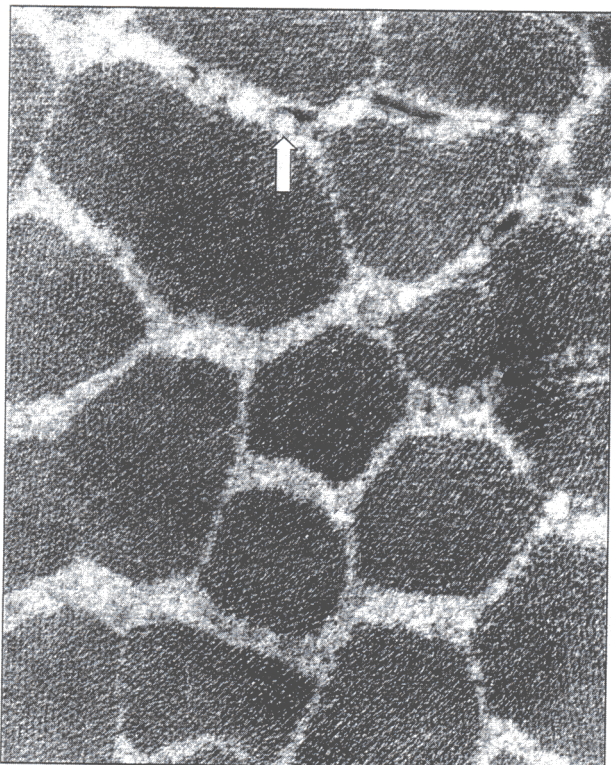


Figura 75.- Corte transversal de un miocito, con sistemas de RS poco manifestas (→) y glucógeno intermiofibrilar (*). V21. 12000x.



Figura 76.- Núcleo de una célula muscular con grandes indentaciones, en zona de miofibrillas estables. V21. 10000x.

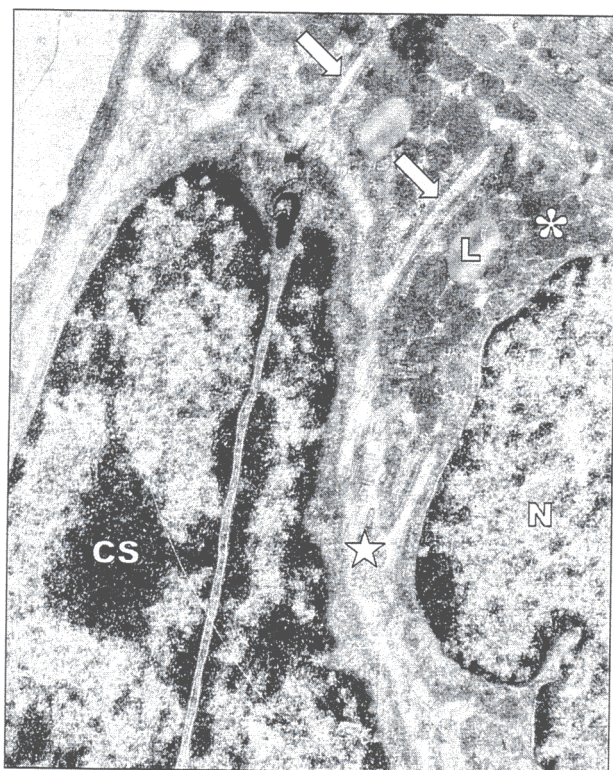


Figura 77.- Célula satélite (CS) y núcleo de miocito adyacente (N), rodeado de mitocondrias (*). Espacio intercelular aumentado (*). Túbulos T (→) que parten de la membrana del miocito. V21. 12000x.

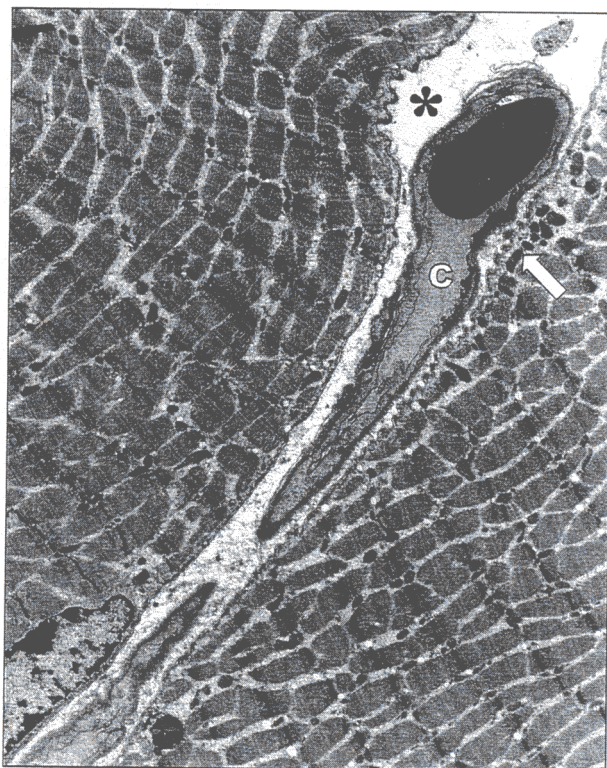


Figura 78.- Espacio intercelular en la zona media de dos miocitos. Retracción de uno de ellos (*) para alojar el capilar (C) algo dilatado. V21. 2000x.

11.4.- VARIACIONES EN LOS ATLETAS DE VELOCIDAD. GRUPO V25.

En el grupo de corredores de distancias cortas que llevan más años practicando esta modalidad deportiva, se encuentran masas musculares de mayor tamaño que en todos los demás, por lo tanto deben presentar variaciones en cuanto a crecimiento en sus dos vertientes, longitudinal y transversal, como reflejo de esta actividad, y continuación de los que hemos descrito en el apartado anterior.

Sus extremos de crecimiento longitudinal siguen siendo muy activos (Figuras 79 80 A y B y 81), en contra de lo que sucedía en el grupo equivalente dedicado a deporte de resistencia. Las membranas celulares en esta localización parecen bien definidas, cuando no hay núcleos en el vértice (Figura 79 →), incluso ligeramente engrosadas en el extremo libre. Pero a mayores aumentos, (Figura 82), no se puede seguir todo el trayecto de la membrana, que parece perderse entre los filamentos de su microambiente (Figura 82 →).

Los núcleos de los miocitos que encontramos en esta localización, siguen presentando la misma morfología y distribución que en el caso anterior, globulosos, con predominio de eucromatina y nucleolos llamativos, que les dan aspecto de células mioblásticas (Figuras 79 N y 81 N). En ocasiones aparecen varios alineados en el borde lateral de estas zonas, incluso alternando con células satélites de aspecto normal, recordando morfología de etapas embrionarias (Figura 80 A y B).

Las miofibrillas de esta porción distal de la fibra muscular, están separadas por bandas de mitocondrias alineadas (Figura 79 *), que recuerdan la disposición del condrioma en las células más abundantes de los atletas de resistencia, pero esta presentación va desapareciendo al acercarse a la zona más ancha de la célula.

En el tejido conjuntivo adyacente a estos extremos, encontramos mayor densidad de sustancia intercelular y los capilares presentan formas abigarradas (Figuras 79 C y 81 C), a veces se aprecia deformación en ellos por presión de las células musculares. Encontramos imágenes sugerentes de apoptosis en células endoteliales, fibroblastos o células linfoides extravasadas, pero en mucha menor proporción que en el grupo equivalente de resistencia.

En los cortes de la porción más ancha de la célula muscular, que corresponden al grupo V25, las fibras alcanzan las mayores dimensiones que hemos detectado, tanto en corte transversal como longitudinal. En estos últimos, las más abundantes son fibras

con haces paralelos, muy ordenados y estables de miofibrillas, sin que se estime el alto número de roturas que en el grupo anterior (Figuras 83, 84, 88 y 90). El grosor de estas miofibrillas es variable dentro de la misma célula, pero no se aprecian inserciones de miofilamentos forzados en las zonas periféricas de las líneas Z. Las roturas que aparecen no se producen por excisión de esta zona en pequeñas fracciones, sino que se altera una de las dos caras de inserción de los filamentos de actina, apareciendo granos de diferente densidad electrónica, como los que habíamos visto en el caso anterior (Figura 85 *).

En las zonas próximas al sarcolema, las miofibrillas se van interrumpiendo escalonadamente (Figura 89 *), sin dar la impresión de que terminen ancladas en ningún sitio, sino libres en el citoplasma a distintos niveles, pero en las zonas de mayor aproximación a la membrana, presenta en su cara interna, unos gránulos muy electrodensos (Figura 89 →), que encontramos también cerca de las proximidades de las líneas Z, así como haces paralelos de miofilamentos.

El RS presenta una distribución igual a la de los velocistas del grupo anterior, pero con cisternas algo más dilatadas. En los cortes longitudinales predominan en las zonas de unión A-I (Figuras 83 → y 84 →) y pueden verse además en las zonas de rotura de la línea Z (Figura 85 →). Al corte transversal, aparecen abundantemente rodeando la figura transversal de los paquetes de miofibrillas, sobre todo en los vértices de estos polígonos (Figura 86 →). Los sacos del retículo atraen mucho más la atención a simple vista, pero los túbulos T, mucho más estrechos, se distinguen con dificultad y por supuesto, no en todos los cortes.

Las mitocondrias son pequeñas y escasas, cercanas a las membranas del RS y por lo tanto con localización intermiofibrilar predominante (Figuras 83 M y 84 M y 86 M). Esporádicamente aparece alguna de mayor tamaño y aumentan en número ligeramente en las zonas de rotura fibrilar. No se encuentran normalmente en localización subsarcolémica y las perinucleares son mayores y más numerosas que en el grupo control, y en el anterior grupo de deportistas de velocidad, cuando el núcleo tiene aspecto globuloso (Figura 88 B M), pero desaparecen casi totalmente en las proximidades de los núcleos más condensado (Figura 88 A).

La reserva energética que tiene como base el glucógeno, se hace muy patente en algunas de estas fibras, con un punteado muy electrodenso entre los haces de miofibrillas, pero sin formar grandes rosetas (Figura 84). Las gotas lipídicas son muy escasas (Figura 88 L), presentándose a veces en las zonas perinucleares.

Los núcleos en esta localización, tienen un aspecto muy abigarrado, con tendencia a presentar indentaciones, que aumentan de forma llamativa en cuanto la células se empieza a contraer (Figura 88 A). La distribución de la cromatina es la típica de las células musculares poco activas, con heterocromatina periférica y poca eucromatina central. En pocas ocasiones pueden verse nucleolos. Su localización no hace protusión en la membrana de la célula, apareciendo a veces bajo la primera hilera de miofibrillas. Sus poros nucleares siguen siendo numerosos y aparentemente permeables.

Las células satélite son escasas y se presentan en disposición similar a las de las muestras de los sujetos control, en las proximidades de los mionúcleos y alineadas con ellos, es decir, sin sobresalir de la superficie de la célula, ocupando una excavación (Figura 87 CS). Las caras laterales de ambas células presentan unas membranas extremadamente próximas en todo su trayecto (Figura 87→).

El tejido conjuntivo en estas zonas alejadas de los extremos de crecimiento longitudinal, tiene un calibre menor que en el grupo control, pero en general no parece estar afectado por fenómenos de compresión. Los capilares presentan un endotelio de calibre variable, desde paredes finas (Figura 90 C), hasta otras más gruesas y rodeadas por una capa de material fibrilar más densa que en el estadio anterior (Figuras 88 B C y 89 C). Las imágenes de pinocitosis son escasas y los núcleos muestran a veces condensación de cromatina de forma periférica muy uniforme, que sugiere las imágenes de una programación para apoptosis (Figura 89 E). Los fibroblastos son la población celular más abundante en este tejido, con citoplasma muy estrecho y rico en organelas.

Junto a estas células, aparecen otras más escasas y que ya hemos descrito en los apartados anteriores, por lo que deducimos, comparando el tipo de forma celular predominante en cada caso, entre sí y con los controles, que el tipo de ejercicio influye en la morfología y proporción de unas y otras células, dependiendo también del tiempo de dedicación al deporte elegido.

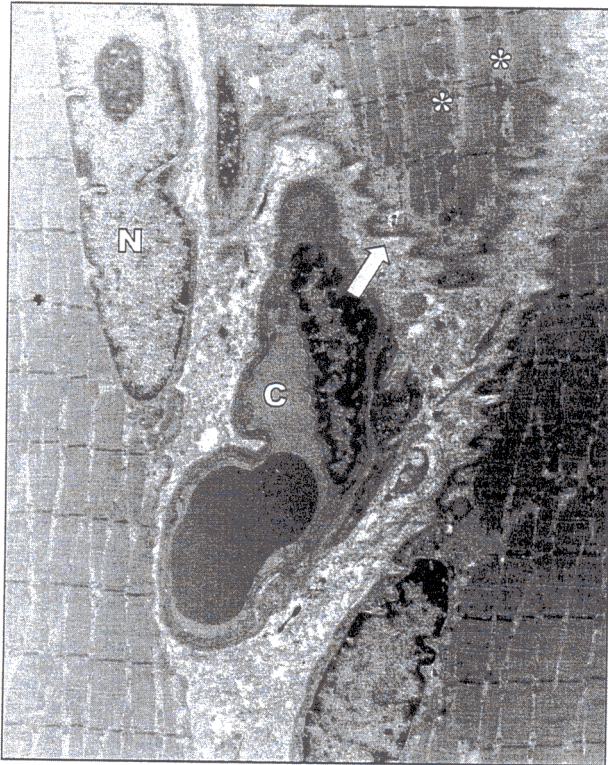


Figura 79.- Crecimiento longitudinal con terminación libre de miofibrillas y mitocondrias interpuestas (*). Membrana celular manifiesta (→). Núcleos de miocitos próximos (N). Conjuntivo rico en matriz intercelular (C). V25. 2500x.

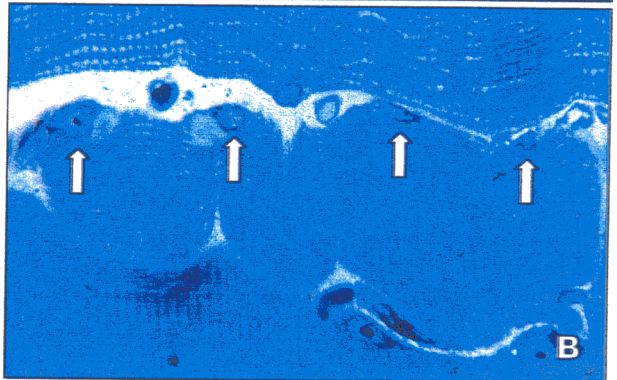
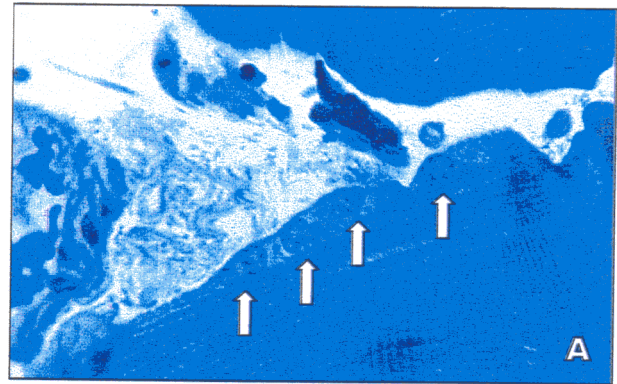


Figura 80 A y B.- Extremos de crecimiento longitudinal con llamativas alineaciones nucleares (→). Conjuntivo rico en fibras. V25. Cortes semifinos. 400x.

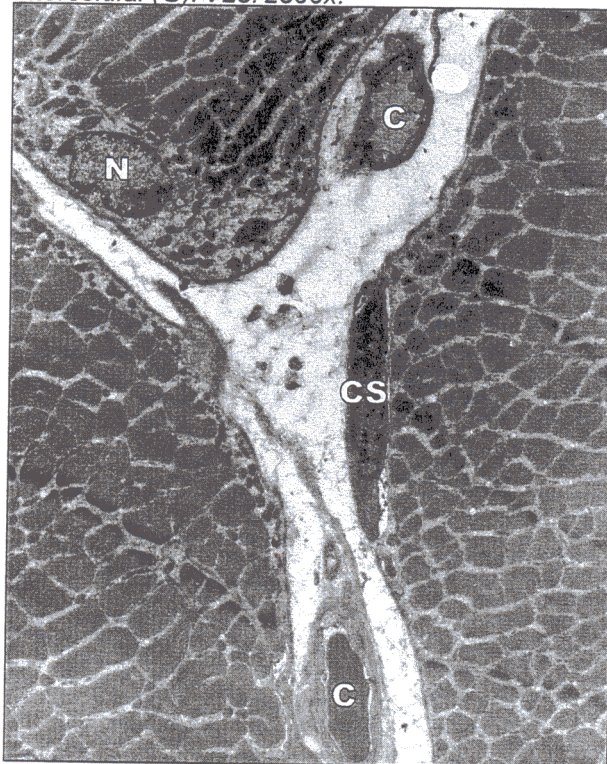


Figura 81.- Extremo de crecimiento con núcleo terminal (N) y mitocondrias perinucleares. Célula satélite en fibra contigua (CS). Conjuntivo rico en vasos (C). V25. 2000x.

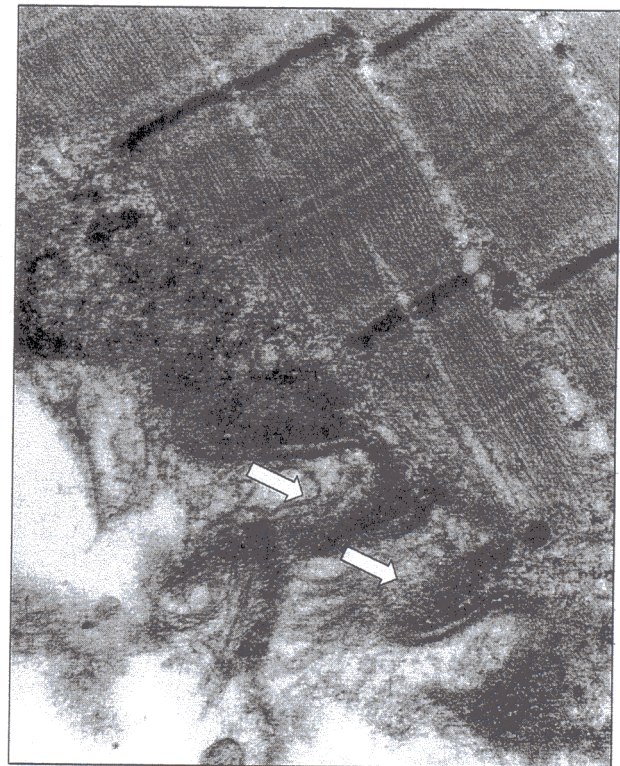


Figura 82.- Aspecto desflechado del sarcoplasma en la zona de crecimiento longitudinal. V25. 10000x.

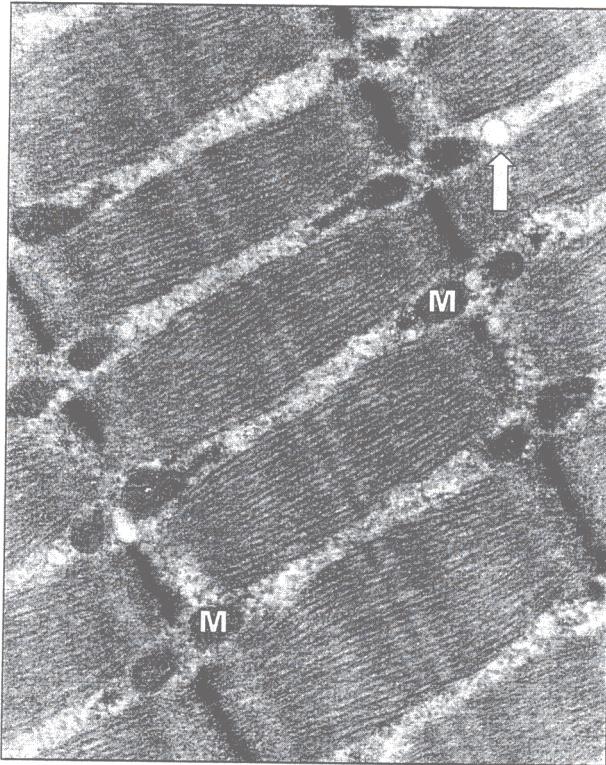


Figura 83.- Corte longitudinal de sarcoplasma, con ordenación geométrica de sus miofibrillas. Sarcómeros alineados y sin roturas. Entre ellas mitocondrias (**M**) y alguna cisterna de RS (\rightarrow). V25. 14000x.

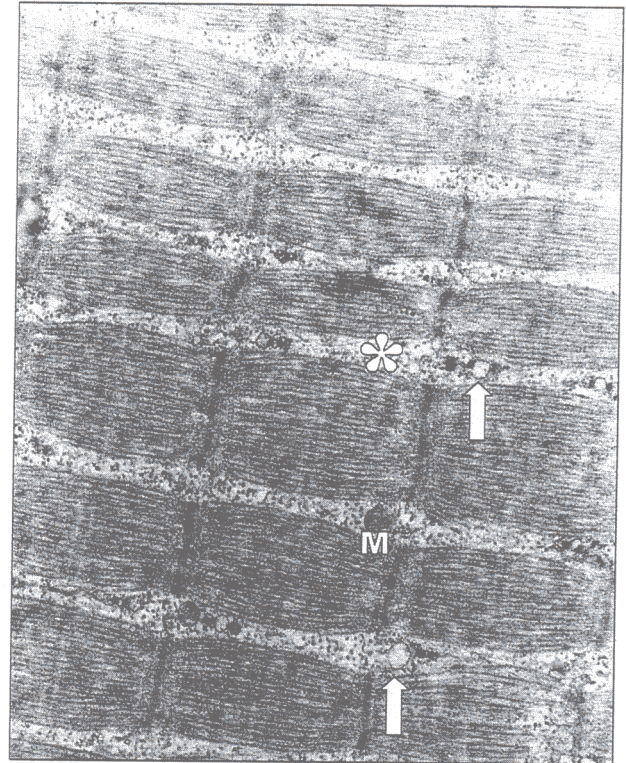


Figura 84.- Aspecto ordenado de miofibrillas en una célula muscular, con gran cantidad de glucógeno entre ellas (*). Pequeñas mitocondrias (**M**) y alguna cisterna de RS (\rightarrow). V25. 8000x.

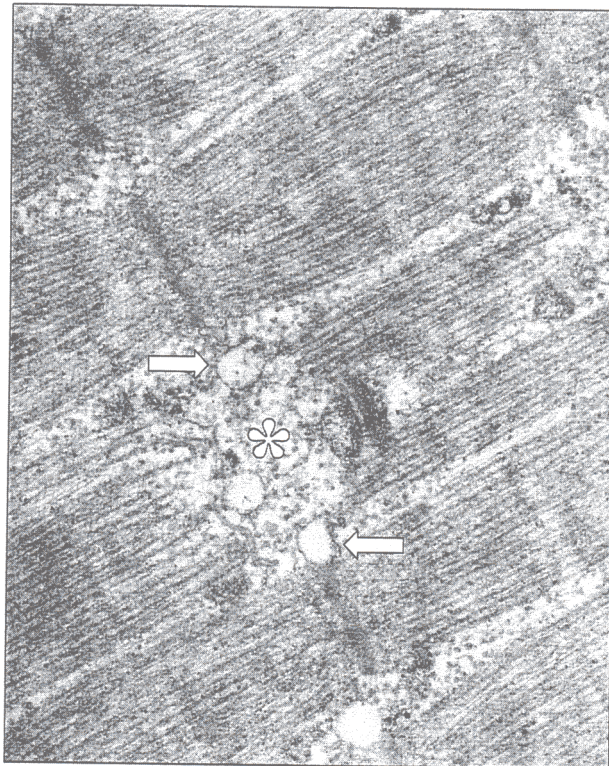


Figura 85.- Zona de rotura de la línea Z (*), con organelas celulares interpuestas (RS \rightarrow). Aspecto normal en el resto de la sarcómera. V25. 14000x.

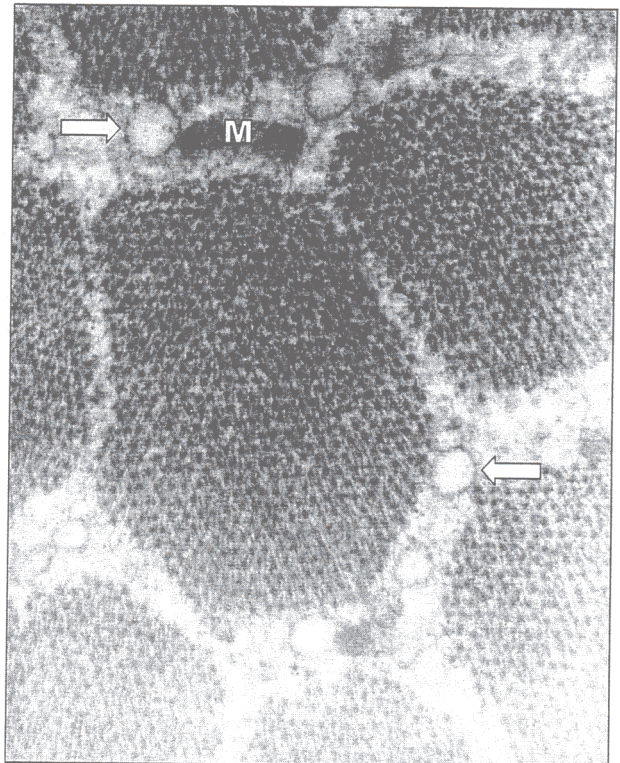


Figura 86.- Corte transversal de una célula muscular con un paquete de miofibrillas rodeado por cisternas de RS (\rightarrow) y alguna mitocondria de pequeño tamaño (**M**). V25. 35000x.

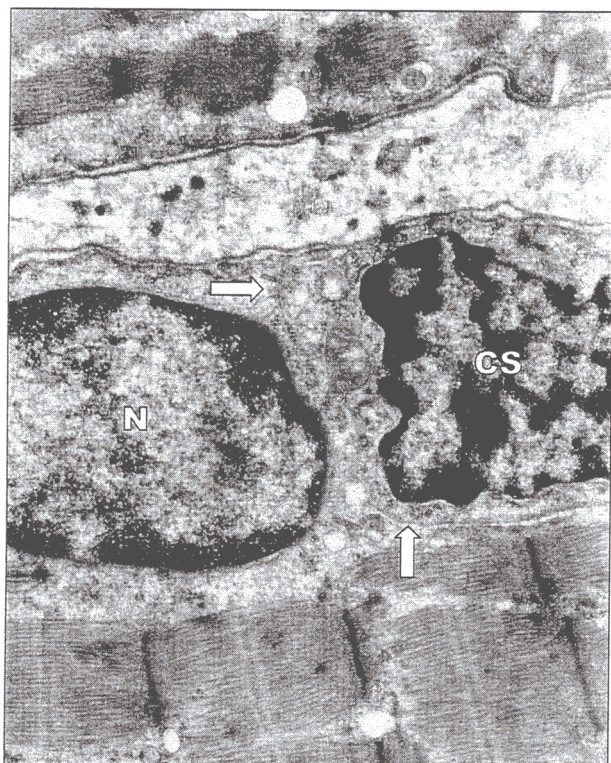


Figura 87.- Núcleos contiguos de célula satélite (CS) y miocito (N). Lámina basal externa común y separación entre las dos membranas celulares (→). V25. 8000x.

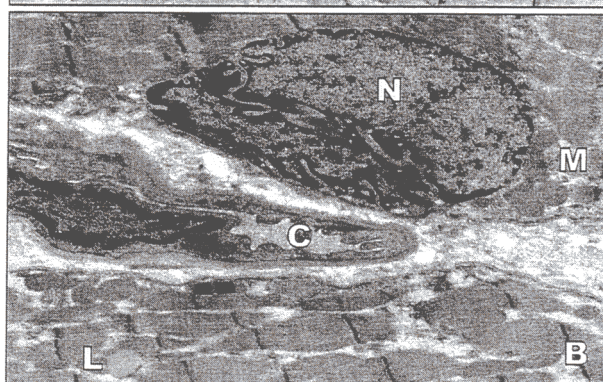
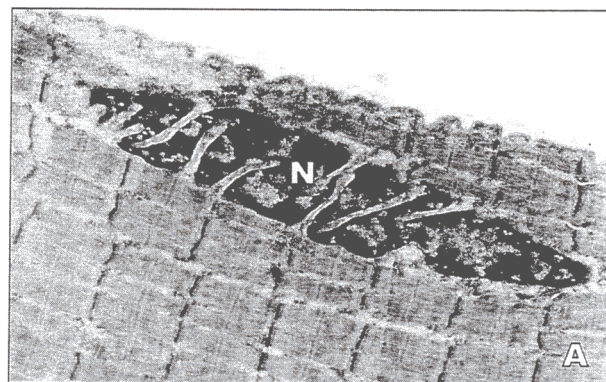


Figura 88.- Núcleos de miocitos (N). A.- Maduro, plegado por la contracción y heterocromático. B.- Mixto, con zona plegada y otra globulosa y eucromática. Mitochondrias perinucleares (M). V25. 3000x.

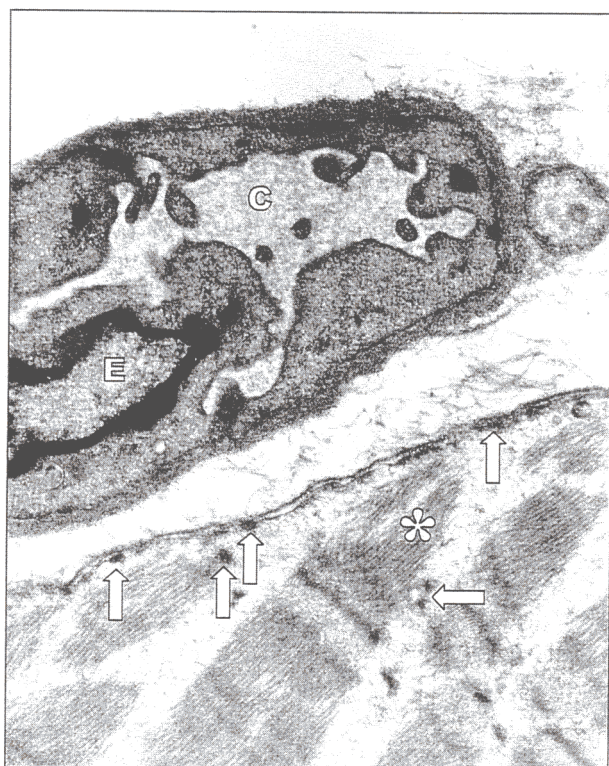


Figura 89.- Zona lateral de un miocito, con terminación libre de miofibrillas (*). Condensaciones electrodensas próximas a la membrana (→). Endotelio ancho con núcleo de aspecto apoptótico (E). V25. 8000x.



Figura 90.- Porción media del borde de los miocitos. Núcleo eucromático (N) en las proximidades de un capilar de aspecto normal (C) y un linfocito extravasado (L). V25. 3000x.

12.- ESTUDIO CUANTITATIVO DE LAS VARIACIONES QUE PRESENTA EL MÚSCULO ESQUELÉTICO SEGÚN LA ACTIVIDAD DEPORTIVA.

Un total de 5200 muestras en 1040 cortes transversales de músculo esquelético, correspondientes al vasto lateral externo de hombres sedentarios y deportistas, entre 18 y 25 años, fueron estudiadas para establecer el porcentaje de cada tipo de fibras y la variación en función de su actividad, según lo expuesto en el protocolo experimental. (Figura 34).

El hecho de disponer de un tamaño de muestra considerable, nos facilita el establecimiento de una subdivisión en grupos, atendiendo al tipo de deporte practicado y al período de tiempo dedicado a él. Esta separación en grupos nos permite un mejor tratamiento estadístico y, en consecuencia obtener unos resultados rigurosos.

La subdivisión de las muestras hace tomando como base, si los cortes analizados en cada caso, corresponden músculo de sujetos del grupo control (C18, C21 y C25), del grupo de deportistas de resistencia (R21 y R25) o del grupo de deportistas de velocidad (V21 y V25). Para sistematizar este trabajo, se han estudiado unas variables que figuran en los objetivos propuestos:

- Porcentajes de los diferentes tipos de fibras.
- Medida del área de corte transversal en los distintos tipos de fibras.
- Volumen mitocondrial en relación al volumen total de la fibra.
- Número de capilares por mm² de superficie muscular.

Para ello ha sido necesario aplicar las técnicas descritas en el apartado correspondiente de metodología: microscopía electrónica, determinaciones enzimáticas por métodos histoquímicos, sistemas informatizados de análisis de imagen, así como técnicas histológicas convencionales. Los datos obtenidos, nos han permitido llevar a cabo el análisis de cada variable, comenzando por las fibras tipo I, comparándolas sucesivamente con todas las fibras homólogas a lo largo de los grupos planteados en el protocolo, continuando posteriormente con la fibras tipo IIa, IIb y IIc, o bien atendiendo solamente a las diferentes muestras poblacionales.

12.1.- VARIACIONES EN PORCENTAJE DE LOS DISTINTOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES.

Este subgrupo se ha definido mediante las técnicas de histoquímica, precisas para cada tipo de fibra, que nos han permitido realizar el estudio del porcentaje de los

distintos tipos, que componen el tejido muscular de los diferentes grupos analizados. Para sistematizar el estudio hemos comenzado por el análisis de las fibras tipo I y hemos comparado dicho volumen con el de todas las fibras homólogas a los largo de los grupos del protocolo propuesto (C21, C25, R21, R25, V21 y V25). Continuando posteriormente con las fibras tipo IIa, IIb y IIc sucesivamente.

12.1.1.- Fibras tipo I.

Considerando el porcentaje de fibras tipo I de las distintas muestras poblacionales, que corresponden a los diferentes grupos control, C18, C21 y C25, comprobamos que no presentan entre ellas una diferencia significativa (C18-I $m=46.9\pm5.9$, C21-I $m=47.1\pm6.2$ y C25-I $m=46.9\pm5.9$). Por lo tanto, al hacer la comparación con los grupos de población deportiva, podemos considerarla como un muestra única, o comparar cada grupo con los correspondientes de la misma edad. (C18=C21=C25). (Figuras 91 y 113).

Sin embargo, cuando cotejamos los porcentajes de fibras tipo I de estos grupos controles, con los restantes grupos de atletas tanto de resistencia (R21 y R25) como de velocidad (V21 y V25), comprobamos que la diferencia que presentan sí es significativa, por lo que debemos cuantificarla convenientemente.

Cuando la comparación se efectúa entre el porcentaje de fibras tipo I del grupo control (C18, C21 y C25) y de los atletas de resistencia (R21 y R25), vemos que este último grupo arroja un aumento del 26% a partir de los tres años de práctica deportiva, y sigue aumentando progresivamente hasta llegar en R25, a un 35% más que en el grupo de población sedentaria. (R21>C21 y R25>C25). (Figuras 92 y 113).

De la valoración comparativa de estos mismos grupos controles (C18, C21 y C25) con los dedicados a deporte de velocidad (V21 y V25), y en relación al tipo I de fibras musculares, vemos que también existe una diferencia significativa, pero en este caso de signo negativo a la anterior, es decir, cuanto mayor es el tiempo de practica del deporte, menor es el porcentaje de este tipo de fibras, de manera que se puede cuantificar en una disminución sería del 25% para los V21 y de un 38% en relación con los V25. (V21>C21 y V25>C25). (Figuras 93 y 113).

Como es lógico, a la vista de los datos anteriores, la diferencia entre los porcentajes de fibras tipo I, de los atletas de resistencia (R21 y R24) y los de velocidad (V21 y V25), debe haber una gran diferencia, y así comprobamos que a los tres años de inicio de ambas modalidades deportivas, la diferencia es de un 68% para R21 sobre

V21, y sigue aumentando hasta el 116%, siempre a favor del grupo de resistencia (R21>>V21 y R25>>V25). (Figuras 106 y 113).

Si ahora estudiamos cómo varía la cantidad de fibras tipo I, en cada una de estas modalidades deportivas, comprobamos que entre los atletas de resistencia existe un aumento del 7% a favor de los que lleva más tiempo practicado el ciclismo (R21-I $m=59.1\pm5.7$ y R25-I $m=63.3\pm4.5$). Así, aunque el incremento más llamativo tiene lugar en los primeros años, el proceso sigue avanzando lentamente durante todo el tiempo que estamos valorando. (R25>R21). (Figuras 107 y 113).

Cuando el grupo estudiado es el de velocistas (V21 y V25), obtenemos unos resultados que difieren en signo con los anteriores, ya que en esta ocasión hay una disminución de 17% de fibras tipo I, para el grupo que lleva más tiempo dedicado a esta modalidad deportiva (V21-I $m=35.2\pm5.7$ y V25 $m=29.3\pm5.7$). (V21>V25). (Figuras 108 y 113).

12.1.2.- Fibras tipo IIa.

Respecto al tipo de fibras IIa de los distintos grupos tanto controles (C18, C21 y C25), como deportistas (R21, V21, R25 y V25), también se encuentran diferencias, que afectan en distinto grado al músculo esquelético, en función de las necesidades que impone cada tipo de deporte y hemos encontrados las siguientes variaciones.

Si estudiamos el porcentaje de fibras tipo IIa dentro del grupo control, vemos que entre ellos no existe diferencia (C18-IIa $m=34.4\pm6.0$, C21-IIa $m=32.8\pm5.7$ y C25-IIa $m=34.1\pm5.4$), por lo cual podríamos reunirlos en un mismo grupo control (C18-C21-C25) para su examen y valoración con los otros grupos de deportistas, pero pequeñas variaciones podrían hacer cambiar un resultado, prefiriendo su estudio por separado. (C18=C21=C25). (Figuras 95 y 114).

De la comparación del tanto por ciento de fibras tipo IIa, del grupo control con los grupos R21 y R25, se desprende la existencia de una disminución muy apreciable en el porcentaje de dichas fibras. Esta disminución es mayor, cuanto mayor es el tiempo transcurrido en la practica del deporte. Su cuantía podemos cifrada en un 26% y 36% respectivamente, para los grupos de tres y siete años de entrenamiento. (C21>R21 y C25>R25). (Figuras 96 y 114).

En este nuevo paso, el porcentaje de fibras tipo IIa del grupo control, lo confrontamos con el mismo tipo de fibras de los grupos de velocidad (V21 y V25),

encontrando un aumento que se manifiesta a favor de los velocistas y además lo hace dependiendo también del tiempo transcurrido desde el inicio de la dedicación al ejercicio. Así, existe una diferencia de un 19% a favor de V21 y un 31% para V25. ($V21 > C21$ y $V25 > C25$). (Figuras 97 y 114).

Cuando comparamos y analizamos los distintos tantos por cientos del tipo de fibras IIa entre los grupos de resistencia y los grupos de velocidad, vemos que existe una marcada diferencia positiva a favor de los velocistas, que es de un 60% a los tres años y sigue en aumento de forma manifiesta hasta un 105%, a los siete años. ($V21 > R21$ y $V25 > R25$). (Figuras 98 y 114).

Si el estudio lo efectuamos comparando los porcentajes de este mismo tipo de fibras, dentro de los grupos formados por atletas de resistencia (R21 y R25), podemos constatar la existencia de una diferencia significativa, con disminución según va aumentando el tiempo. Esta diferencia es de un 14% ($R21-IIa\ m=25.1 \pm 5.3$ y $R25-IIa\ m=21.6 \pm 3.1$), es decir, en este último momento la velocidad de disminución numérica es aproximadamente la mitad que en los tres primeros años de práctica deportiva. ($R21 > R25$). (Figuras 107 y 114).

Una situación inversa nos encontramos enfrentamos a los atletas de velocidad entre sí. En este caso, se aprecia un incremento del 10% a favor del grupo de más edad, ($V21-IIa\ m=40.1 \pm 4.8$ y $V25-IIa\ m=44.2 \pm 4.6$), siendo además el grupo que alcanza un mayor valor absoluto en este tipo de fibras. ($V25 > V21$). (Figuras 108 y 114).

12.1.3.- Fibras tipo IIb.

Prosiguiendo con el análisis del tipo de fibras, nos adentramos en la comparación de las variaciones que sufren las IIb, que junto con el grupo anterior, constituyen la población de fibras de contracción rápida del músculo. Como en todos los casos, debemos llevarlo a cabo, tanto en las muestras de los controles (C18, C21 y C25), como en las de los diferentes grupos de resistencia y de velocidad (R21, R25, V21 y V25).

En el estudio de los diferentes grupos control, vemos que el porcentaje de fibras tipo IIb, no presenta una diferencia estadísticamente significativa ($C18-IIb\ m=18.0 \pm 7.4$, $C21-IIb\ m=19.3 \pm 6.7$ y $C25-IIb\ m=19.3 \pm 10.0$), hecho que ya era de esperar, dado que en los resultados anteriores, que conforman la gran mayoría, ninguna significación se ha hecho patente. ($C18=C21=C25$). (Figuras 99 y 115).

Siguiendo el estudio comparativo de las fibras tipo IIb de los grupos controles (C18, C21 y C25), en relación con el mismo tipo de fibras de los atletas de resistencia (R21 y R25), encontramos que a medida que transcurre el tiempo dedicado a la práctica deportiva, disminuye este tipo de fibra y así apreciamos con una diferencia del 29% y 35% cuando comparamos la muestra control con la R21 y la R25 respectivamente. ($R21 < C21$ y $R25 < C25$). (Figuras 100 y 115).

Cuando la muestra enfrentada es la población control y la muestra de velocistas (V21 y V25), vemos que para el tipo de este tipo de fibras, tiene lugar el fenómeno contrario que en los de resistencia, aumentando progresivamente con el paso del tiempo, para llegar en el primer estadio a un 20% más que en el control y un 36% a los siete años de entrenamiento. ($V21 > C21$ y $V25 > C25$). (Figuras 101 y 115).

Así mismo cuando las muestras comparadas son las de resistencia, con las de los velocistas para el tipo de fibras IIb, se comprueba que presentan una diferencia positiva a favor de los velocistas, en relación con los atletas de resistencia, que si lo valoramos con respecto al tiempo de realización del ejercicio, vemos que se va incrementando paulatinamente. Dicha diferencia es de un 67% y 111% si las comparamos a los tres años o a los siete años ($V21 > R21$ y $V25 > R25$). (Figuras 102 y 115).

Respecto al estudio comparativo de los grupos de resistencia entre sí (R21 y R25) y en lo que compete a las fibras del tipo IIb nos encontramos con el curioso hecho de que no hay diferencia significativa entre ambos porcentajes de fibras ($R21-IIb\ m=13.5\pm6.9$ y $R25-IIb\ m=12.3\pm4.8$). ($R21=R25$). (Figuras 107 y 115).

Cuando la comparación la efectuamos entre las atletas de velocidad, comprobamos que existe un aumento de un 15% ($V21-IIb\ m=22.6\pm8.0$ y $V25-IIb\ m=26.0\pm7.3$), en el transcurso de los últimos cuatro años de práctica deportiva ($V21 < V25$). En este caso parece que el aumento se mantiene bastante alto durante todo el proceso. ($V21 < V25$). (Figuras 108 y 115).

12.1.4.- Fibras IIc.

Por último y en relación al estudio efectuado sobre las variaciones de porcentaje de fibras tipo IIc entre todos los grupos estudiados (C18, C21, C25, R21, V21, R25 y V25), vemos que son las fibras menos numerosas en valor absoluto, encontrando los siguientes resultados.

Al comparar entre sí las muestras control (C18, C21 y C25), y aplicando el análisis estadístico, vemos que para este tipo de fibras tampoco existen diferencias (C18 $m=0.9\pm0.5$, C21 $m=0.8\pm0.5$ y C25 $m=0.8\pm0.5$). Como en casos anteriores, aunque puede considerarse globalmente en las comparaciones sucesivas, preferimos hacerlo independientemente. (C18=C21=C25). (Figuras 103 y 116).

Cuando se confrontaron los grupos controles (C18, C21 y C25), con los grupos de atletas de resistencia (R21 y R25), se constató que el tipo de fibras IIc iba en incremento en relación con el tiempo de dedicación al deporte. La diferencia oscilaba entre un 140% para los ciclistas más jóvenes y un 225% para los que llevan alrededor de siete años de entrenamiento. (R21>>C21 y R25>>C25). (Figuras 104 y 116).

Ya en el grupo de los velocistas (V21 y V25) estas diferencias cuando se comparan con el grupo control, arrojan unos resultados que difieren de los anteriores, puesto que en vez de aumentar, disminuyen significativamente según se van alargando los tiempos de dedicación al deporte, y así, esta disminución es del 16% y 28% respectivamente según hayan transcurrido tres o seis años. (V21<C21 y V25<C25). (Figuras 105 y 116).

Cuando la medición se efectuó para comparar los porcentajes de las fibras tipo IIc que existían entre los grupos de resistencia (R21 y R25) y los velocistas (V21 y V25), observamos que también presentaban una marcada diferencia y que ésta se incrementaba con el paso del tiempo. Entre los velocistas y los de resistencia que llevaban ya tres años de entrenamiento, la diferencia ascendía a un 65% y hasta un 78% cuando comparábamos las muestras a los siete años. (R21>>V21 y R25>>R21). (Figuras 106 y 116).

Por último la comparación del tanto por ciento de las fibras tipo IIc, entre los atletas de resistencia (R21 y R25), arrojó el resultado de un incremento positivo con relación al tiempo de práctica deportiva del 35% (R21-IIc $m=2.0\pm0.7$ y R25-IIc $m=2.7\pm1.4$). (R25>R21). (Figuras 107 y 116).

El mismo planteamiento del apartado anterior, efectuado entre los grupos de velocistas, mostró un incremento negativo, en el mismo período de tiempo (V21-IIc $m=0.7\pm0.4$ y V25-IIc $m=0.6\pm0.3$), de forma que en este último estadio presenta el menor número, en valor absoluto, de todos los tipos de fibras. (V25>V21). (Figuras 108 y 116).

Todos estos resultados, quedan recogidos de forma abreviada para su valoración en conjunto, en las figuras 109, 110, 111 y 112, y en la tabla XIII.

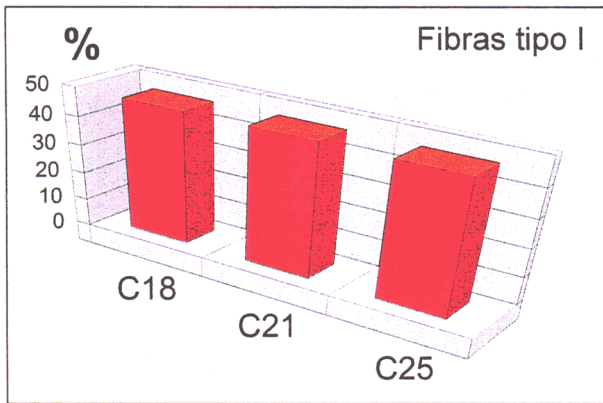


Figura 91.- Representación comparativa porcentual de las muestras de los distintos grupos controles. Fibras tipo I. C18, C21 y C25.

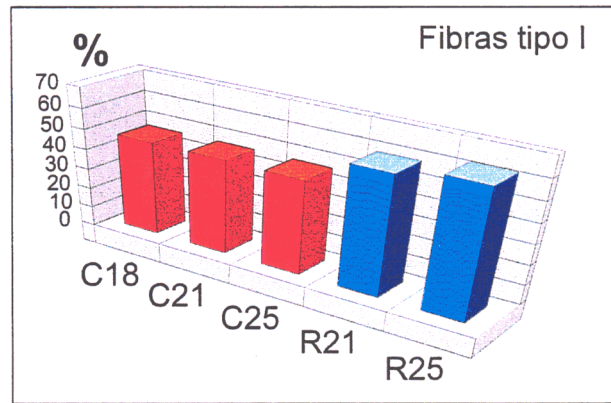


Figura 92.- Representación comparativa porcentual entre los grupos control y de resistencia. Fibras tipo I. C18, C21, C25, R21 y R25.

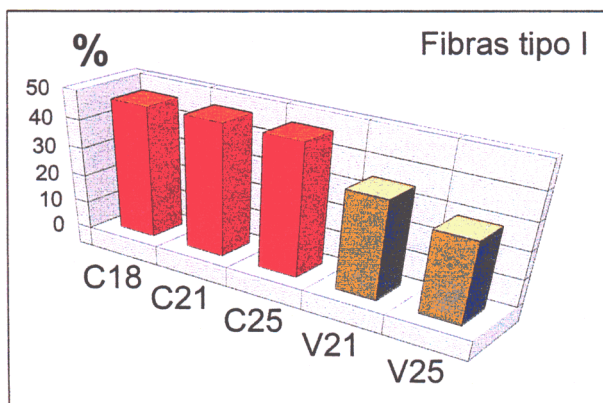


Figura 93.- Representación comparativa porcentual entre los grupos control y los de velocidad. Fibras tipo I. C18, C21, C25, V21 y V25.

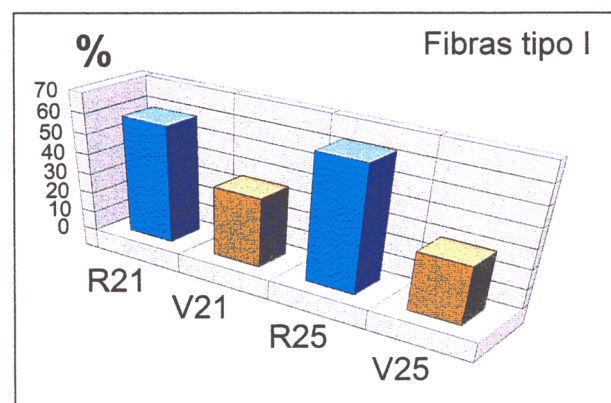


Figura 94.- Representación comparativa porcentual entre los grupos de resistencia y de velocidad. Fibras tipo I. R21, V21, R25 y V25.

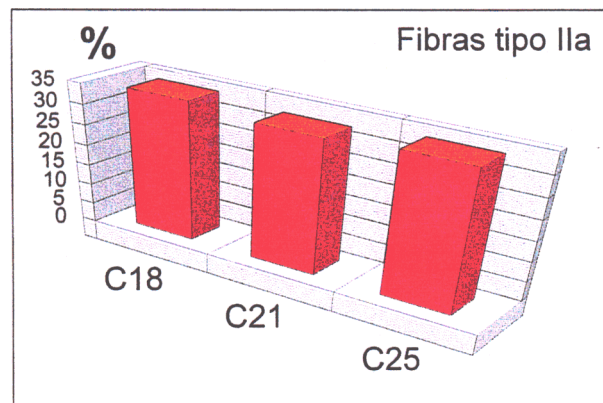


Figura 95.- Representación comparativa porcentual de las muestras de los distintos grupos controles. Fibras tipo IIa. C18, C21 y C25.

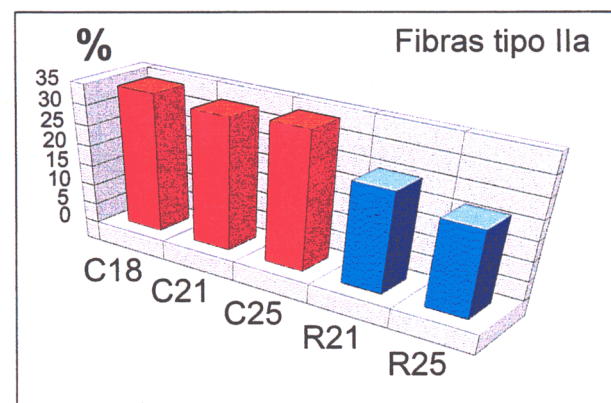


Figura 96.- Representación comparativa porcentual entre los grupos control y de resistencia. Fibras tipo IIa. C18, C21, C25, R21 y R25.

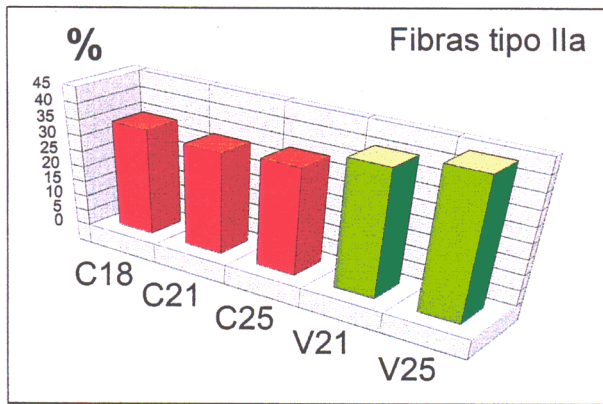


Figura 97.- Representación comparativa porcentual entre los grupos control y los de velocidad. Fibras tipo IIa. C18, C21, C25, V21 y V25.

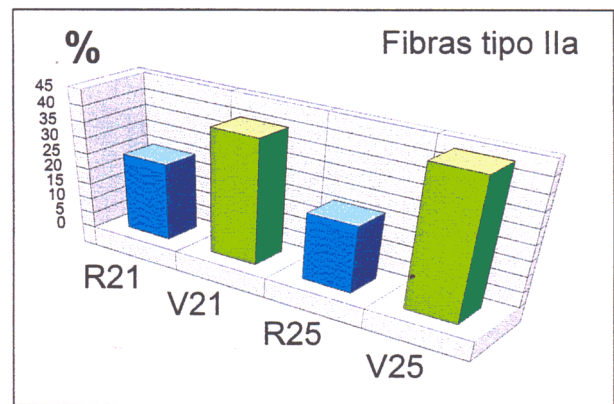


Figura 98.- Representación comparativa porcentual entre los grupos de resistencia y los de velocidad. Fibras tipo IIa. R21, V21, R25 y V25.

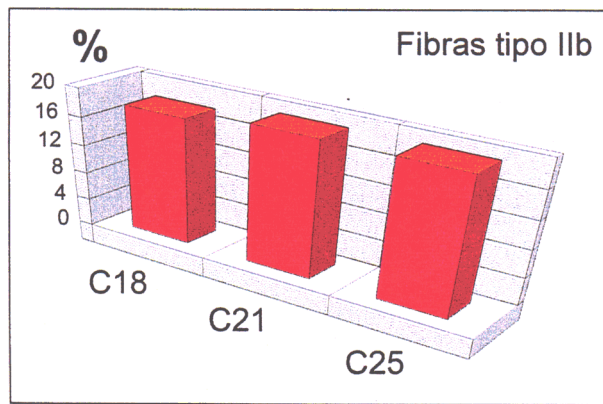


Figura 99.- Representación comparativa porcentual de las muestras de los distintos grupos controles. Fibras tipo IIb. C18, C21 y C25.

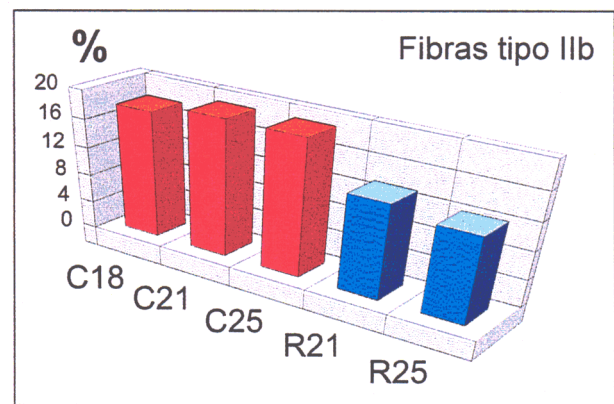


Figura 100.- Representación comparativa porcentual entre los grupos control y los de resistencia. Fibras tipo IIb. C18, C21, C25, R21 y R25.

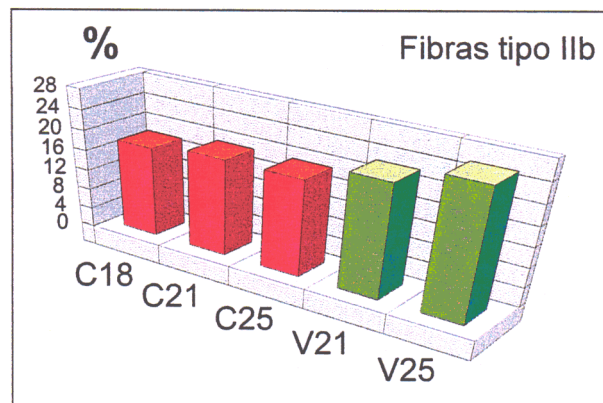


Figura 101.- Representación comparativa porcentual entre los grupos control y los de velocidad. Fibras tipo IIb. C18, C21, C25, V21 y V25.

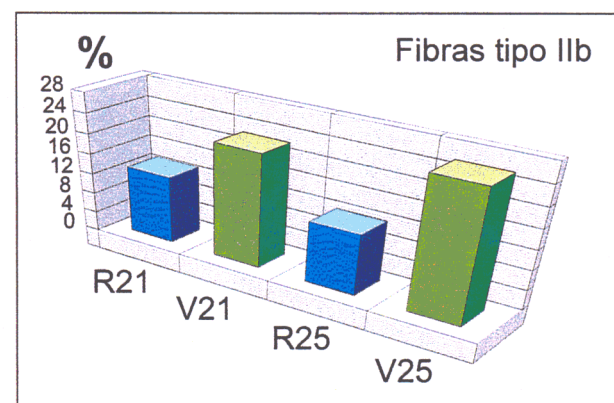


Figura 102.- Representación comparativa porcentual entre los grupos de resistencia y los de velocidad. Fibras tipo IIb. R21, V21, R25 y V25.

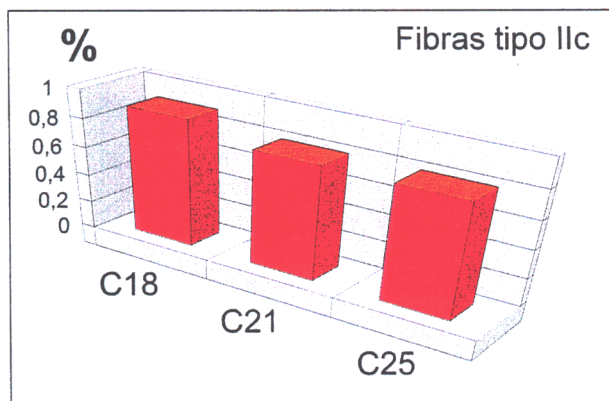


Figura 103.- Representación comparativa porcentual de las muestras de los distintos grupos controles. Fibras tipo Ilc. C18, C21 y C25.

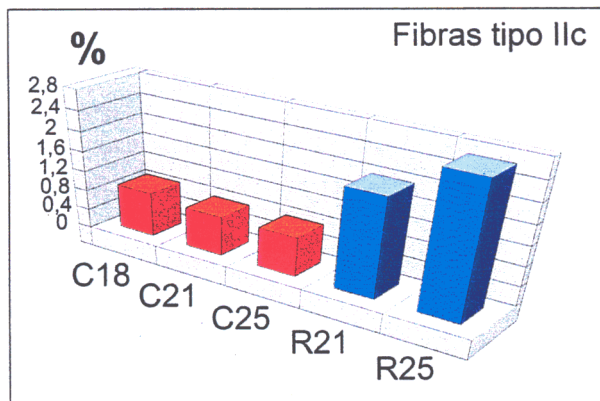


Figura 104.- Representación comparativa porcentual entre los grupos control y los resistencia. Fibras tipo Ilc. C18, C21, C25, R21 y R25.

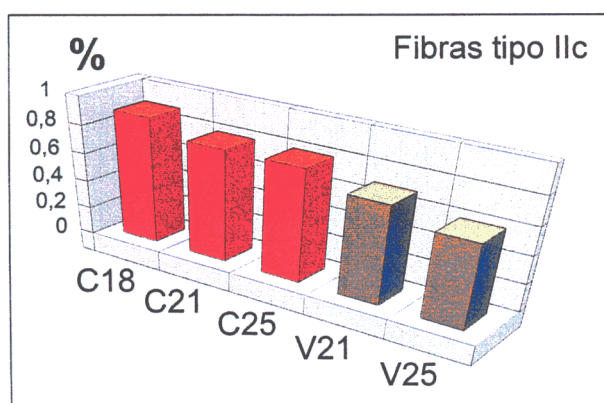


Figura 105.- Representación comparativa porcentual entre los grupos control y los de velocidad. Fibras tipo Ilc. C18, C21, C25, V21 y V25.

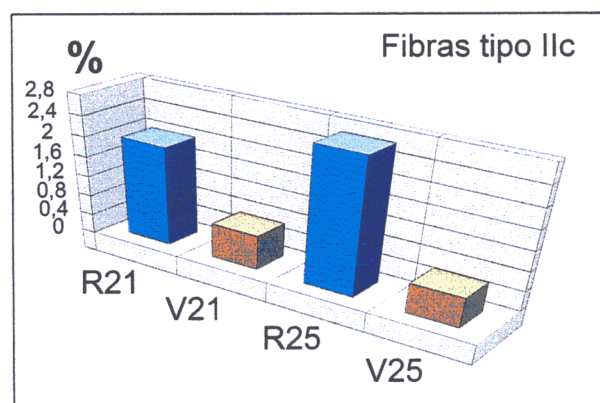


Figura 106.- Representación comparativa porcentual entre los grupos de resistencia y de velocidad. Fibras tipo Ilc. R21, V21, R25 y V25.

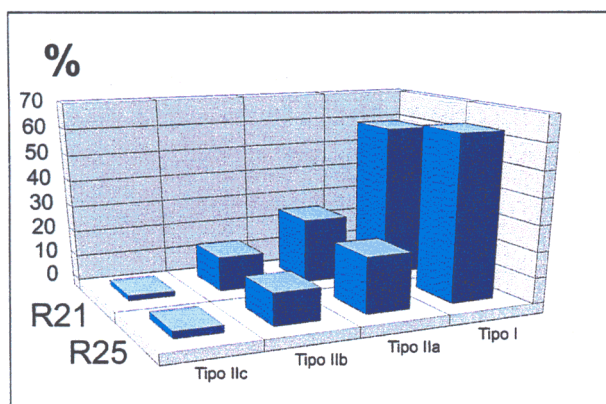


Figura 107.- Representación comparativa porcentual entre los grupos de resistencia en función del tipo de fibra. Fibras tipo I, Ila, Ilb y Ilc. R21 y R25.

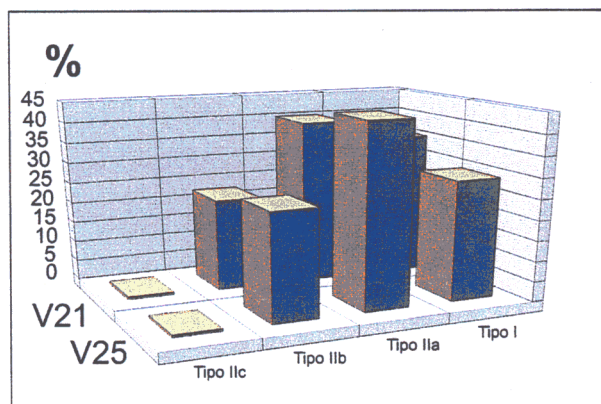


Figura 108.- Representación comparativa porcentual entre los grupos de velocidad en función del tipo de fibra. Fibras tipo I, Ila, Ilb y Ilc. V21 y V25.

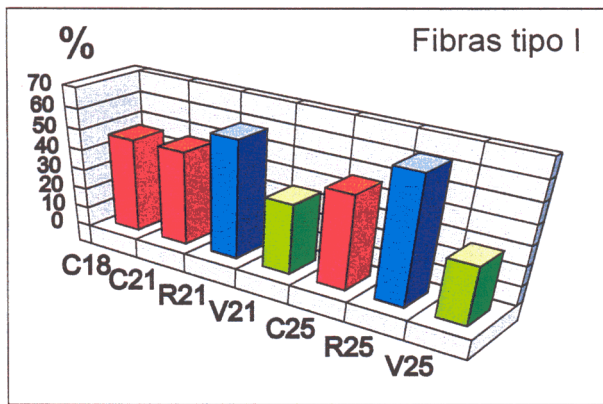


Figura 109.- Representación comparativa porcentual entre los distintos grupos control, resistencia y de velocidad. Fibras tipo I. C18, C21, R21, V21, C25, R25 y V25.

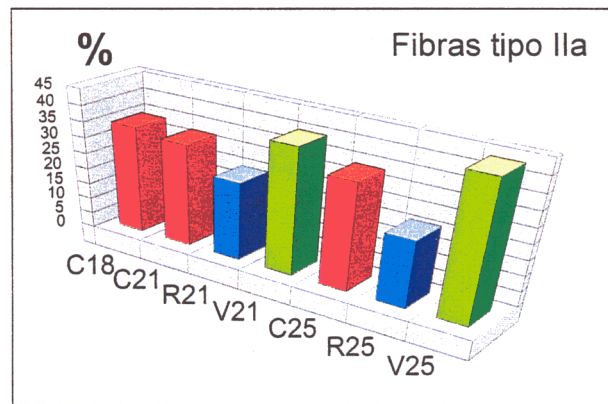


Figura 110.- Representación comparativa porcentual entre los distintos grupos control, resistencia y de velocidad. Fibras tipo IIa. C18, C21, R21, V21, C25, R25 y V25.

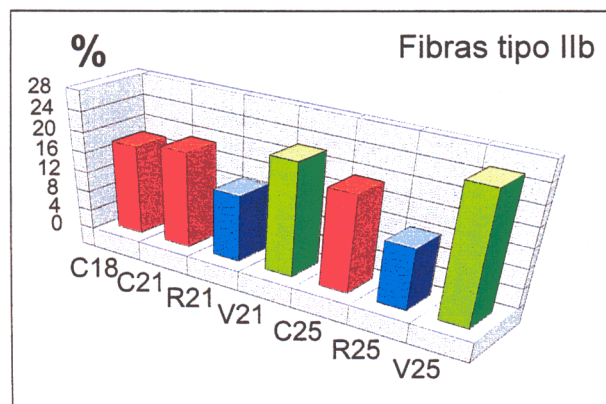


Figura 111.- Representación comparativa porcentual entre los distintos grupos control, resistencia y de velocidad. Fibras tipo IIb. C18, C21, R21, V21, C25, R25 y V25.

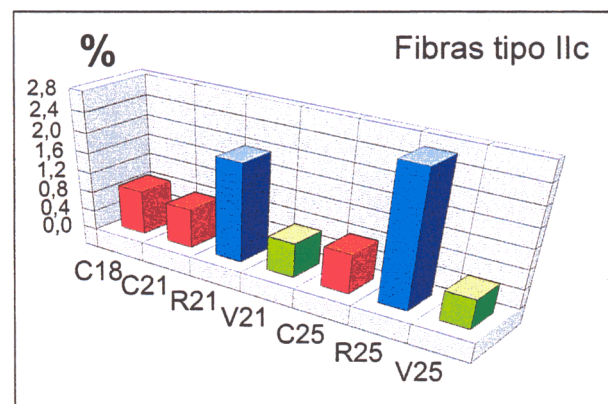


Figura 112.- Representación comparativa porcentual entre los distintos grupos control, resistencia y de velocidad. Fibras tipo IIc. C18, C21, R21, V21, C25, R25 y V25.

	Fibras tipo I	Fibras tipo IIa	Fibras tipo IIb	Fibras tipo IIc
C18	46.9±5.9	34.4±6.0	18.0±7.4	0.9±0.5
C21	47.1±6.2	32.8±5.7	19.3±6.7	0.8±0.5
C24	46.9±5.9	34.1±5.4	19.3±10.0	0.8±0.5
R21	59.1±5.7	25.1±5.3	13.5±6.9	2.0±0.7
V21	35.2±5.7	40.1±4.8	22.6±8.0	0.7±0.4
R24	63.3±4.5	21.6±3.1	12.3±4.8	2.7±1.4
V24	29.3±5.7	44.2±4.6	26.0±7.3	0.6±0.3

Tabla XIII.- Cuadro resumen comparativo de los resultados obtenidos en el estudio de la distribución porcentual de los diferentes tipos de fibra en cada grupo del protocolo experimental.

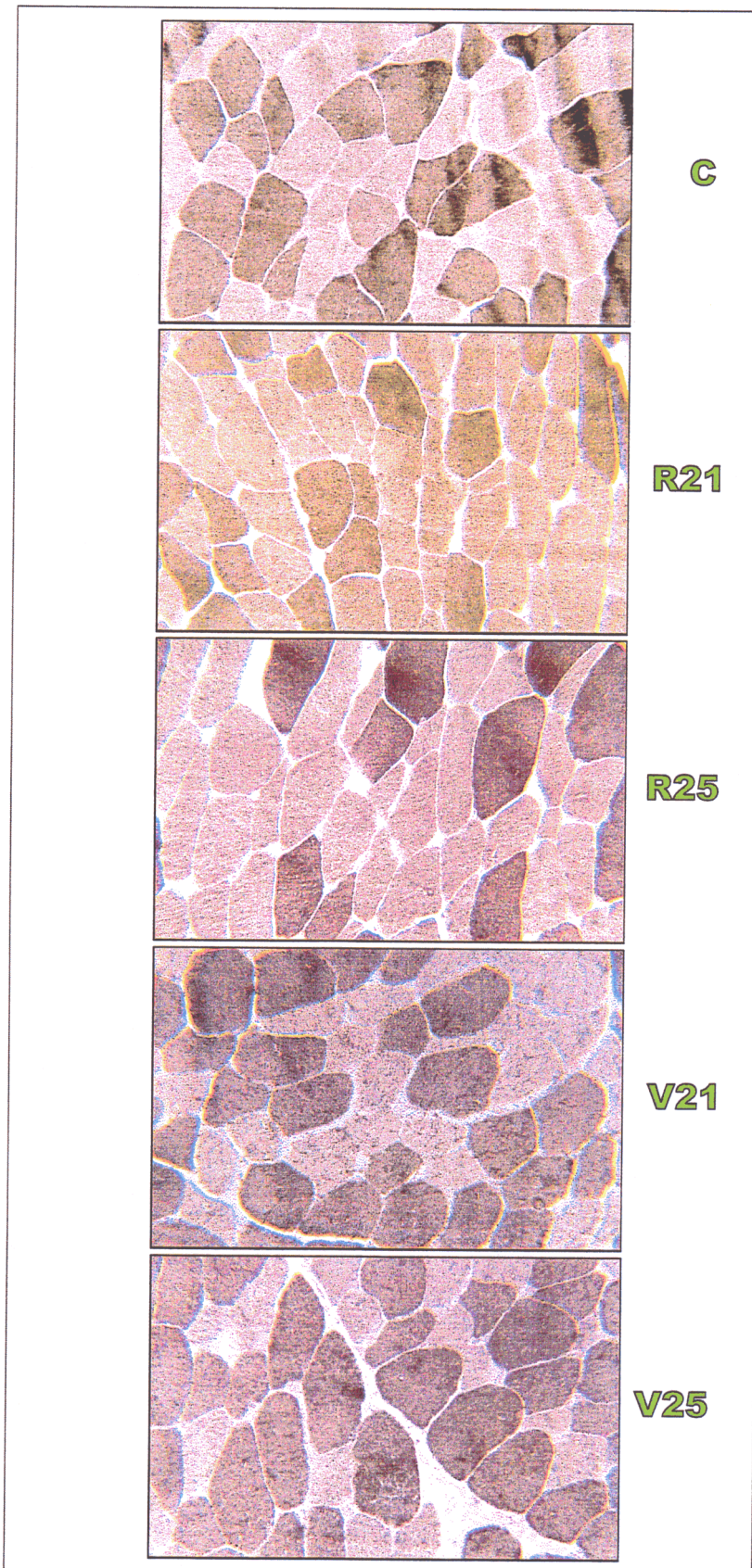


Figura 113.- Corte transversal de tejido muscular. Se observa la diferente proporción de fibras tipo I (claras) así como la superficie de corte transversal de cada grupo experimental. ATPasa pH 9,4 400x.

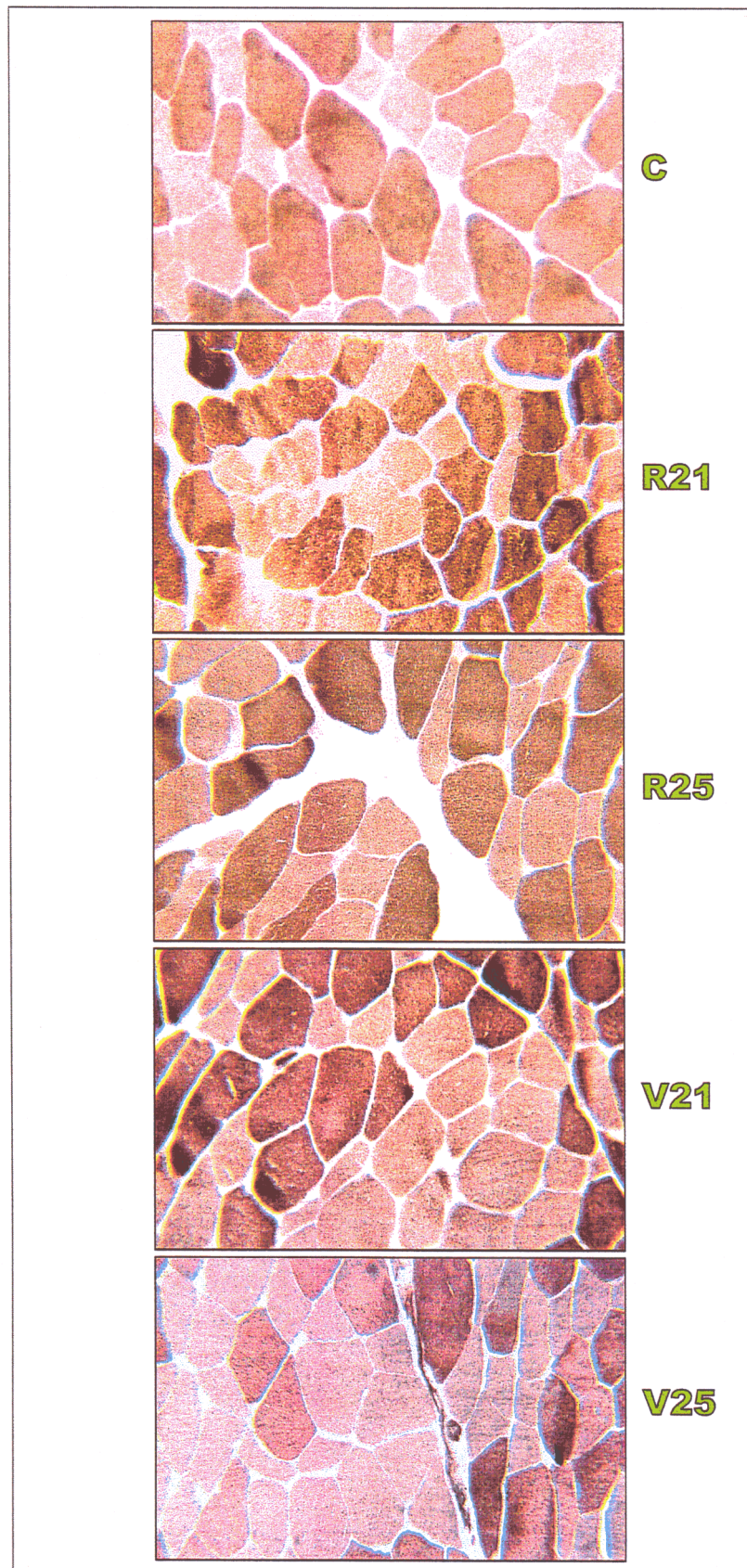


Figura 114.- Corte transversal de tejido muscular. Se observa la diferente proporción de fibras tipo IIa (claras) así como la superficie de corte transversal de cada grupo experimental. ATPasa pH 4,6. 400x

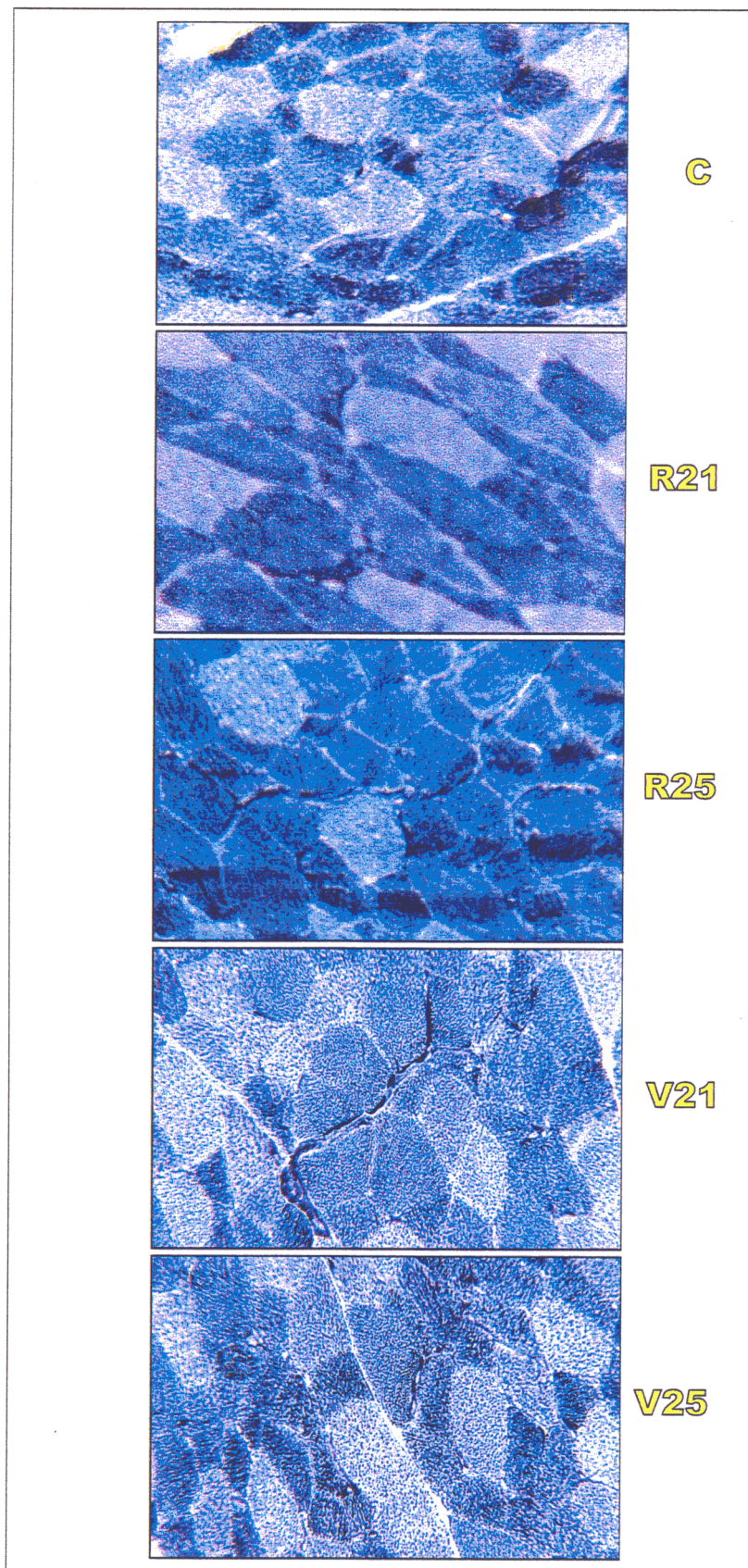


Figura 115.- Corte transversal de tejido muscular. Se observa la diferente proporción de fibras tipo IIb (claras) así como la superficie de corte transversal de cada grupo experimental. NADH-TR. 400x.

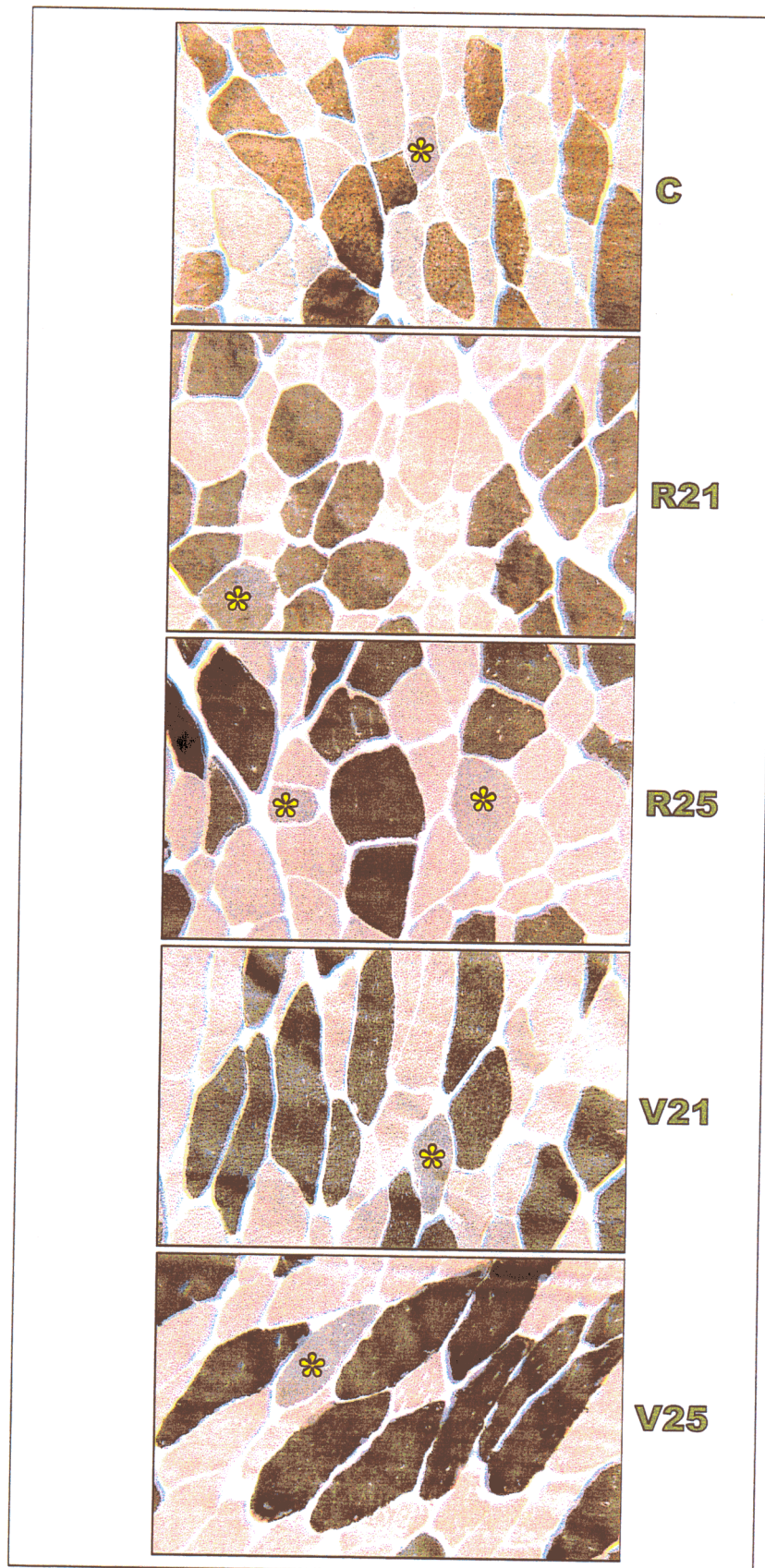


Figura 116.- Corte transversal de tejido muscular. Se observa la diferente proporción de fibras tipo IIc (intermedias, *) así como la superficie de corte transversal de cada grupo experimental. ATPasa pH 4,3. 400x.

12.2.- CAMBIOS EN LAS DIMENSIONES DE LA SUPERFICIE MEDIA DE CORTE TRANSVERSAL DE LOS DISTINTOS TIPOS DE FIBRAS.

Siguiendo con el estudio de variaciones cuantitativas, nos adentramos ahora en las que presenta la superficie de corte transversal de los distintos tipos de fibras homólogas, realizando el análisis de la variable en los diferentes grupos de la población total. Los cortes utilizados, definen las poblaciones celulares en función de reacciones enzimáticas funcionales y se valoraron mediante un programa morfométrico en analizador de imagen.

Las muestras empleadas para llevar a cabo este estudio son las mismas que las utilizadas en el estudio del parámetro anterior, por lo tanto haremos referencia a las imágenes ya mostradas al plantear la valoración comparativa, en cuanto a la superficie media de cada tipo de fibra (Figuras 113 a 116).

12.2.1.- Fibras tipo I.

En primer lugar, cuando se comparan las fibras tipo I del grupo control C21 con sus correspondientes del grupo C25, observamos que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre ellas (C21-I $m=4657.0\pm720.2$ y C25-I $m=4670.9\pm555.5$), y pueden considerarse nuevamente como un único grupo comparativo o compararse por separado, porque el resultado no varía significativamente. (C21=C25). (Figuras 117 y 113).

Cuando comparamos este tipo de fibras, con las del mismo tipo de los grupos de resistencia (R21 y R25), los resultados alcanzados son diferentes, habiendo un incremento de superficie de corte transversal, de hasta un 25% en las R21, para continuar más lentamente durante el resto del tiempo de entrenamiento hasta llegar en los deportistas de 25 años, a alcanzar el 28%. (R21>C21 y R25>C25). (Figuras 118 y 113).

Si comparamos la superficie de corte de las fibras tipo I de las muestras control, con la misma variable de los velocistas, observamos que no existe una discrepancia con los que han desarrollado el deporte durante tres años, pero sí se manifiesta un aumento de superficie en las de seis años (V25) en relación al grupo control. Es una diferencia menor que en los atletas de resistencia y podemos cuantificar en un 9% aproximadamente. (V21=C21 y V25>C25). (Figuras 119 y 113).

En el enfrentamiento de los grupos de velocidad y resistencia, encontramos que transcurridos los tres primeros años la diferencia entre ellos es de un 20% a favor de los de resistencia, tanto por ciento que disminuye al 15% a los seis años, porque en los velocistas, el crecimiento en grosor en este periodo, sigue teniendo lugar, mientras que entre los ciclistas se va estabilizando. ($R_{21} > V_{21}$ y $R_{25} > V_{25}$). (Figuras 120 y 113).

Cuando se aplica el método estadístico y comparamos las fibras tipo I de los atletas de resistencia (R_{21-I} $m=5820.6 \pm 708.7$ y R_{25-I} $m=5952.1 \pm 758.8$), vemos que a partir de un momento, la práctica deportiva durante más tiempo, no afecta a la variable propuesta en esta población porque no existe diferencia significativa entre ellos. ($R_{21}=R_{25}$). (Figuras 133 y 113).

Sin embargo en el grupo de velocistas (V_{21-I} $m=4639.7 \pm 763.7$ y V_{25-I} $m=5077.0 \pm 837.1$) se comprueba que durante el mismo periodo para entrenamiento en carrera corta, la superficie de corte transversal en este tipo de fibras aumenta y esta diferencia viene a ser de un 9%. ($V_{25} > V_{21}$). (Figuras 134 y 113)

12.2.2.- Fibras tipo IIa.

Una vez efectuado el estudio comparativo de las fibras tipo I en todos los grupos entre sí, expondremos los resultados obtenidos cuando el análisis lo realizamos con las fibras de contracción rápida tipo IIa.

Al enfrentar la superficie de corte de las fibras tipo IIa, de los dos grupos controles (C21 y C25), obtenemos los siguientes resultados: no hay discrepancia entre los datos de ambas series (C_{21-IIa} $m=5287.3 \pm 617.2$ y C_{25-IIa} $m=5276.8 \pm 604.3$). Al no existir diferencia entre estas dos series, para estudios posteriores se pueden considerar como una sola, o compararlas por separado con sus grupos homólogos. ($C_{21}=C_{25}$). (Figuras 121 y 114).

Los datos obtenidos de la comparación de los grupos control (C21 y C25) con los grupos de resistencia (R_{21} y R_{25}), nos indican en sus resultados que existe un incremento de la superficie de las fibras, proporcional al tiempo de ejercicio de esta actividad y que se tabula como un incremento del 7% a favor de las R_{21} y de un 10% en relación con las R_{25} . ($R_{21} > C_{21}$ y $R_{25} > C_{25}$). (Figuras 122 y 114).

Si comparamos los grupos control (C21 y C25) con los grupos de velocistas (V_{21} y V_{25}), apreciamos que también se manifiesta un incremento y este es superior al

obtenido con los grupos de resistencia, referidos en el párrafo anterior. Este aumento es de un 11% en V21 y de un 34% en V25. ($V21 > C21$ y $V25 > C25$). (Figuras 123 y 114).

Al estudiar los componentes más activos entre sí, que serían los atletas de resistencia (R21 y R25) y los de velocidad (V21 y V25), observamos que no existe una desigualdad estadística entre los de resistencia y los velocistas de tres años, manifestando así mismo un aumento de un 23% las fibras de los V25 sobre las R25. ($R21 = V21$ y $R25 < V25$). (Figuras 124 y 114).

Los resultados obtenidos en la comparación de las fibras tipo IIa de los grupos de resistencia en entre sí, nos ponen de manifiesto la no existencia de una diferencia apreciablemente llamativa entre ambos grupos (R21-IIa $m=5648.5 \pm$ y R25-IIa $m=5827 \pm 760.0$). ($R21 = R25$). (Figuras 133 y 114).

Resultados completamente diferentes nos da el estudio de los atletas de velocidad (V21-IIa $m=5838.5 \pm 877.4$ y V25-IIa $m=7102.3 \pm 1144.4$) entre sí. Ya que aquí sí se verifica una desigualdad con un porcentaje de alrededor del 22% a favor de las fibras tipo IIa de los V25, siendo además el grupo de fibras que alcanza mayores dimensiones transversales de todo nuestro estudio ($V25 > V21$). (Figuras 134 y 114).

12.2.3.- Fibras tipo IIb.

Abordaremos ahora el estudio de la segunda fibra, que junto a la anterior presenta una contracción rápida y que son las tipo IIb. Siguiendo los mismos pasos, describiremos las distintas variaciones de cada grupo en el tiempo, comparándolas entre ellas y con las diferentes actividades.

Cuando se analizó la superficie de las fibras tipo IIb, de los grupos que componían el conjunto de los controles (C21 y C25), hallamos en nuestros resultados, como nos había ocurrido ya anteriormente en otros tipos de fibras (I y IIa), que estadísticamente tampoco existía una diferencia significativa (C21-IIb $m=4563.1 \pm 714.7$ y C25-IIb $m=4747.6 \pm 772.4$). Por consiguiente como en casos anteriores pueden considerarse o no, como una sola muestra. ($C21 = C25$). (Figuras 125 y 115).

En el estudio comparativo de cada grupo control (C21 y C25) con las fibras tipo IIb de los grupos de resistencia (R21 y R25), constatamos un incremento a favor de estos últimos que podemos evaluar en un 17% para los R21 y un 26% para los R25. ($R21 > C21$ y $R25 > C25$). (Figuras 126 y 115).

Siguiendo con los resultados, y con el enfrentamiento de los referidos grupos control (C21 y C25) y los velocistas dentro del mismo tipo de fibras, obtenemos unos datos mediante los cuales podemos argumentar que sí existe una disparidad que se pone de manifiesto presentando un incremento del 17% y del 31% en beneficio de los V21 y V25 respectivamente. ($V21 > C21$ y $V25 > C25$). (Figuras 127 y 115).

Evaluada las superficies de las fibras tipo IIb del grupo R21 con los velocistas V21, vemos que no hay diferencia significativa entre ellos, y continuando con el estudio y comparando ahora el grupo R25 con el V25 tampoco se encuentra diferencia significativa con los velocistas de más tiempo, por lo que podemos pensar que la variación que hemos visto en cada grupo de deportistas con respecto al grupo control, sufre el incremento de superficie de corte de forma paralela con cualquier tipo de ejercicio. ($R21 = V21$ y $R25 = V25$). (Figuras 128 y 115).

Dentro de este tipo de fibras hemos cotejado los dos grupos de resistencia entre sí, y comprobamos que hay un aumento significativo que se incrementa con el tiempo llegando a un 8%. ($R21-IIb\ m=5424.7 \pm 772.1$ y $R25-IIb\ m=5867.9 \pm 766.9$). ($R25 > R21$). (Figuras 133 y 115).

Los datos analizados en relación a la superficie de las fibras tipo IIb de los atletas de velocidad, muestran un incremento del 11% a lo largo de los cuatro años de diferencia de la practica deportiva ($V21-IIb\ m=5469.0 \pm 790.9$ y $V25-IIb\ m=6083.6 \pm 922.1$). ($V25 > V21$). (Figuras 134 y 115).

12.2.4.- Fibras tipo IIc.

A continuación y como último apartado del estudio de la superficie de corte transversal de los distintos tipos de fibras, nos adentraremos en los resultados obtenidos al valorar las fibras de metabolismo y características intermedias, que constituyen el tipo IIc, en los diferentes grupos de nuestra muestra poblacional (C21, C25, R21, R25, V21 y V25).

En la comparación de este tipo fibrilar, dentro del grupo de los controles, se aprecia una diferencia estadísticamente significativa entre ambas muestras, que corresponde a un incremento de las C25 sobre las C21 ($C21-IIc\ m=4301.1 \pm 600.6$ y $C25-IIc\ m=4538.7 \pm 534.5$). Esta diferencia, aunque pequeña, ha sido estimada en un 5%. Ya que en este caso los dos grupos controles han puesto de manifiesto la diferencia que existe entre ambos, tendremos que estudiarlos por separado en el enfrentamiento con el resto de las poblaciones (R21, R25, V21 y V25). Las fibras IIc del grupo control C21

son las que menor superficie de corte presentan, en valor absoluto, entre todas las de su misma categoría estudiadas. ($C21 < C25$). (Figuras 129 y 116).

El enfrentamiento del grupo control C21, con el grupo de ciclistas R21, aporta una diferencia importante, de hasta un 32% a favor del grupo de deportistas y paralelamente al valorar las fibras tipo IIc del grupo C25 con el mismo tipo del grupo R25, también presentan un mayor tamaño las de los atletas, con una diferencia del 30%. Es decir, con el mayor tiempo dedicado a esta modalidad deportiva, la velocidad de cambio en el tamaño de estas fibras se mantiene casi constante. ($R21 > C21$ y $R25 > C25$). (Figuras 130 y 116).

Las fibras IIc de los estudiantes C21 se han comparado con las del mismo tipo de los deportistas dedicados a carrera de su misma edad (V21), obteniendo una diferencia del 21 % a favor del grupo problema. Con un planteamiento paralelo, valorando los grupos C25 y V25, también en este caso se ha producido un mayor aumento en el grupo que hace ejercicio, con un 20% a su favor. ($V21 > R21$ y $V25 > R25$). (Figuras 131 y 116).

Dentro del estudio dedicado a la superficie fibrilar tenemos que reseñar la diferencia entre las fibras tipo IIc de los grupos de resistencia (R21 y R25) y los grupos de velocidad (V21 y V25). Vemos que existe una diferencia entre las fibras de R21 en relación con las V21. Esta diferencia es positiva a favor de las de resistencia un 8%. La diferencia existente entre las fibras de los R25 y los de velocidad V25, es positiva a favor de las de resistencia, también en 8%. ($R21 > V21$ y $R25 > V25$). (Figuras 132 y 116).

Pasamos a continuación a la comparación de los grupos de resistencia (R21 y R25) entre sí, y encontramos que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambas ($R21-IIc\ m=5680.6 \pm 707.2$ y $R25-IIc\ m=5879.2 \pm 747.5$), a favor de los deportistas que han llevado a cabo su entrenamiento reglamentado durante más años. ($R25 > R21$). (Figuras 133 y 116).

Si el estudio lo realizamos entre las fibras tipo IIc de los grupos de velocidad, comprobamos que en este caso si aparecen ambas muestras significativamente diferentes ($V21-IIc\ m=5223.0 \pm 761.0$ y $V25\ m=5446.2 \pm 807.4$), aunque en pequeña proporción, pues existe un aumento de superficie a favor de las V25. Dicha diferencia es de un 4%. ($V25 > V21$). (Figuras 134 y 116).

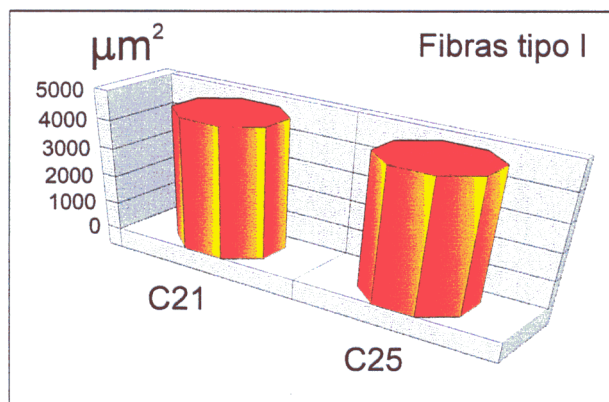


Figura 117.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los distintos grupos control. Fibras tipo I. C21 y C25.

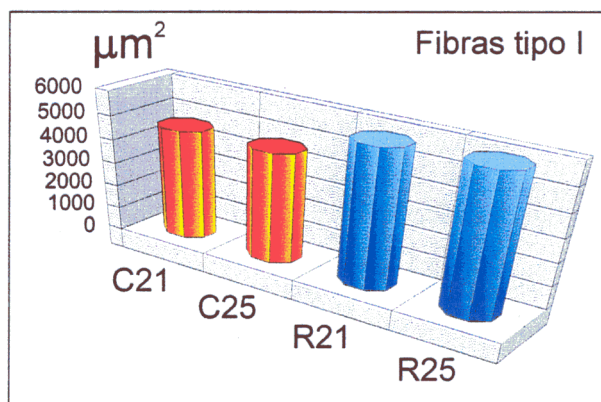


Figura 118.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los grupos control y los de resistencia. Fibras tipo I. C21, C25, R21 y R25.

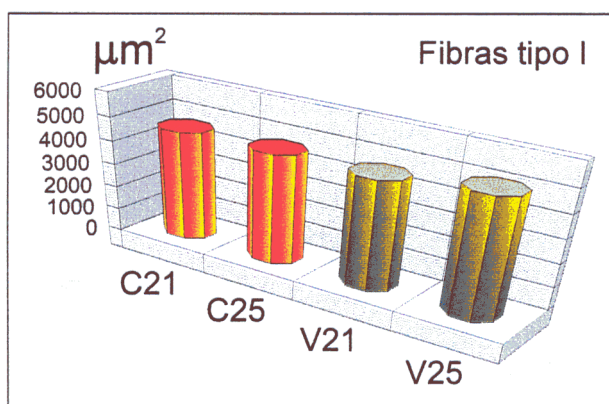


Figura 119.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los grupos control y los de velocidad. Fibras tipo I. C21, C25, V21 y V25.

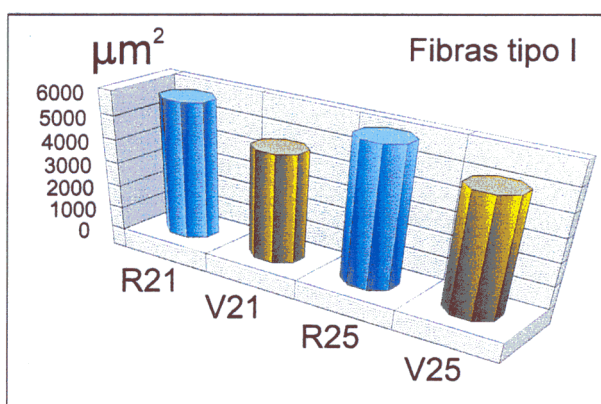


Figura 120.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los grupos de resistencia y los de velocidad. Fibras tipo I. R21, V21, R25 y V25.

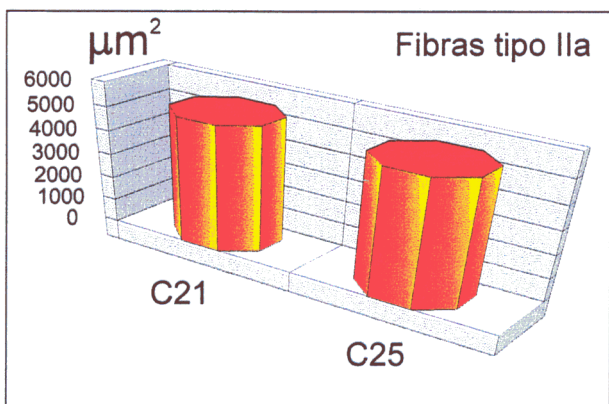


Figura 121.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los distintos grupos control. Fibras tipo IIa. C21 y C25.

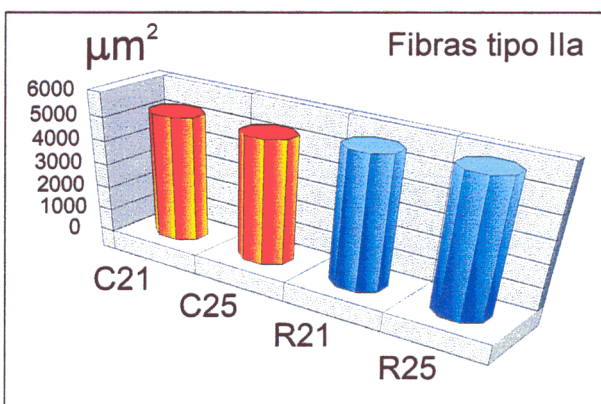


Figura 122.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los grupos control y los de resistencia. Fibras tipo IIa. C21, C25, R21 y R25.

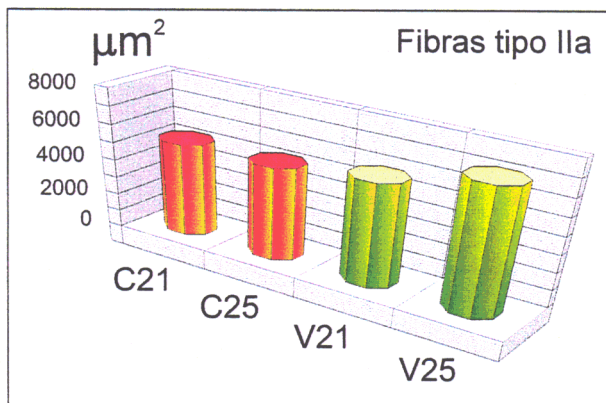


Figura 123.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los grupos control y los de velocidad. Fibras tipo IIa. C21, C25, V21 y V25.

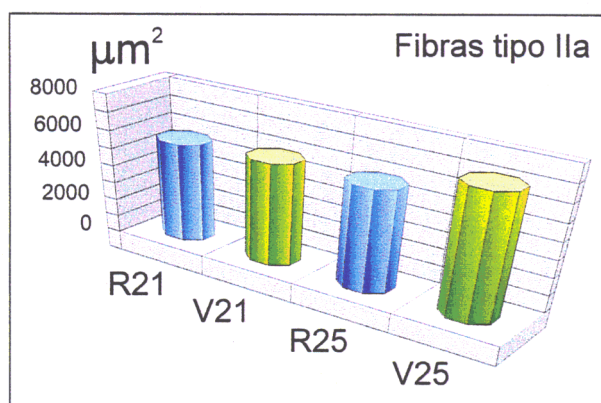


Figura 124.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los grupos de resistencia y los de velocidad. Fibras tipo IIa. R21, V21, R25 y V25.

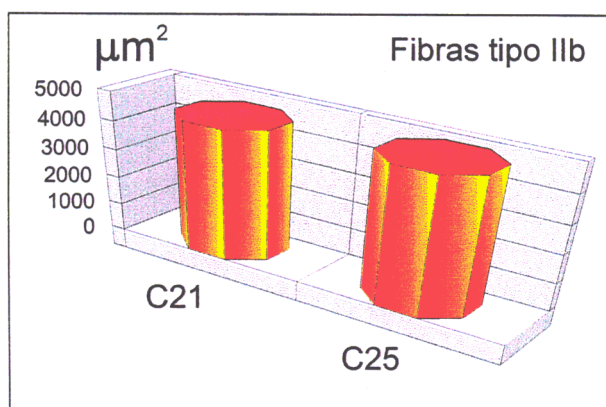


Figura 125.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los distintos grupos control. Fibras tipo IIb. C21, C25.

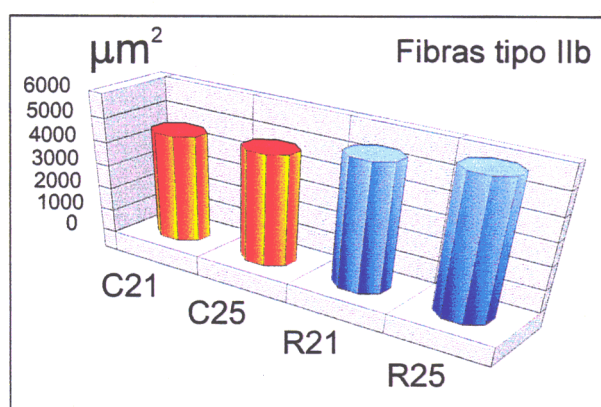


Figura 126.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los grupos control y los de resistencia. Fibras tipo IIb. C21, C25, R21 y R25.

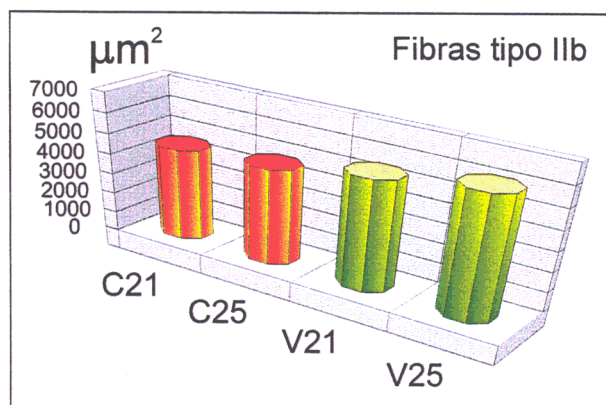


Figura 127.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los grupos control y los de velocidad. Fibras tipo IIb. C21, C25, V21 y V25.

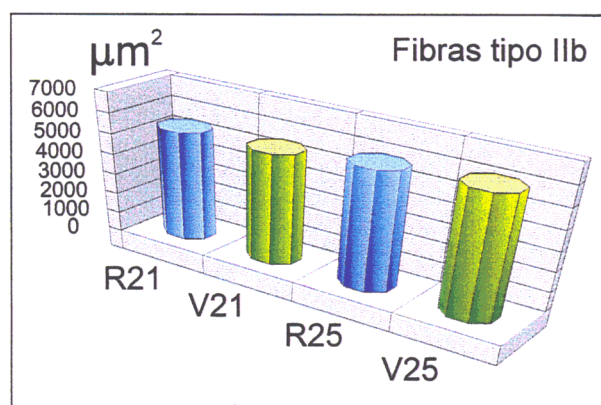


Figura 128.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los grupos de resistencia y los de velocidad. Fibras tipo IIb. R21, V21, R25 y V25.

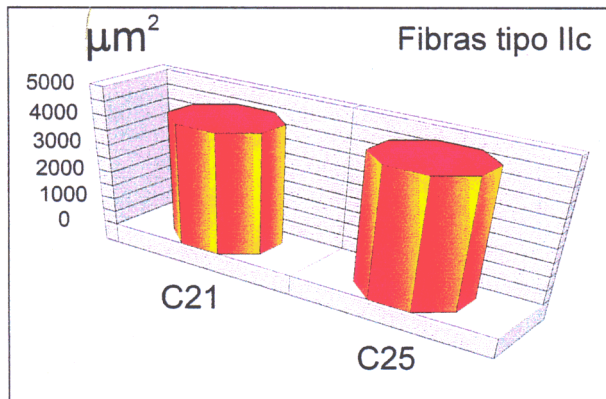


Figura 129.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los distintos grupos control. Fibras tipo Ilc. C21 y C25.

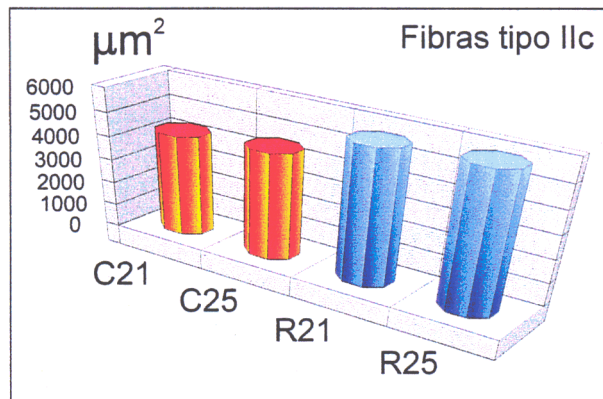


Figura 130.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los grupos control y los de resistencia. Fibras tipo Ilc. C21, C25, R21 y R25.

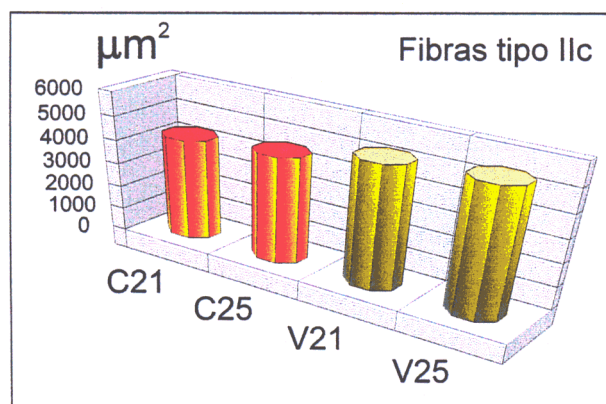


Figura 131.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los grupos control y los de velocidad. Fibras tipo Ilc. C21, C25, V21 y V25.

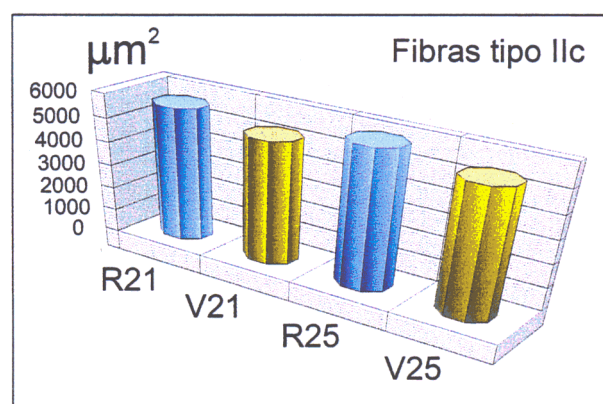


Figura 132.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los grupos de resistencia y los de velocidad. Fibras tipo Ilc. R21, V21, R25 y V25.

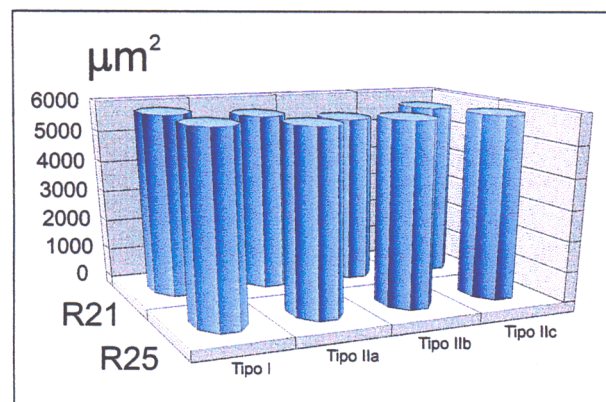


Figura 133.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los grupos de resistencia, en función del tipo de fibras. Fibras tipo I, IIa, IIb y IIc. R21 y R25.

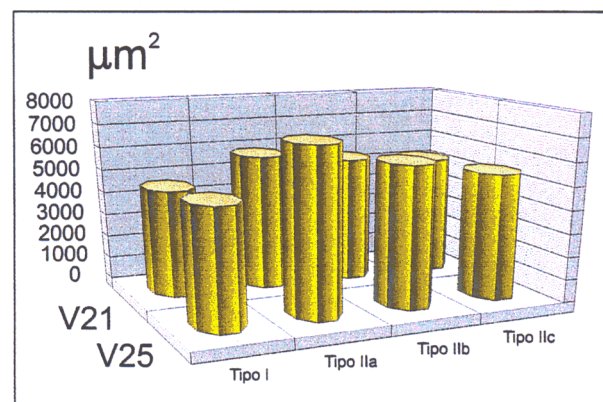


Figura 134.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los grupos de resistencia, en función del tipo de fibras. Fibras tipo I, IIa, IIb y IIc. V21 y V25.

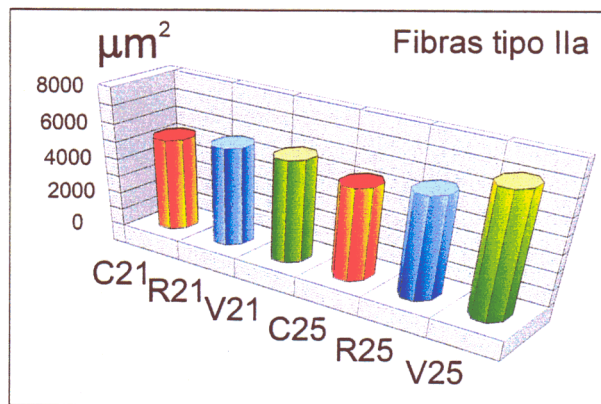
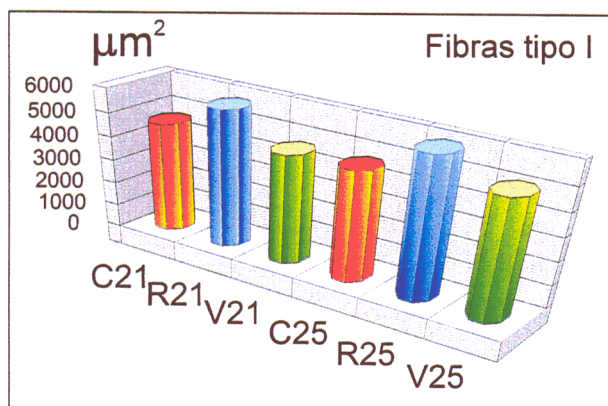


Figura 136.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los grupos control, de resistencia y de velocidad. Fibras tipo I. C21, R21, V21, C25, R25 y V25.

Figura 136.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los grupos control, de resistencia y de velocidad. Fibras tipo IIa. C21, R21, V21, C25, R25 y V25.

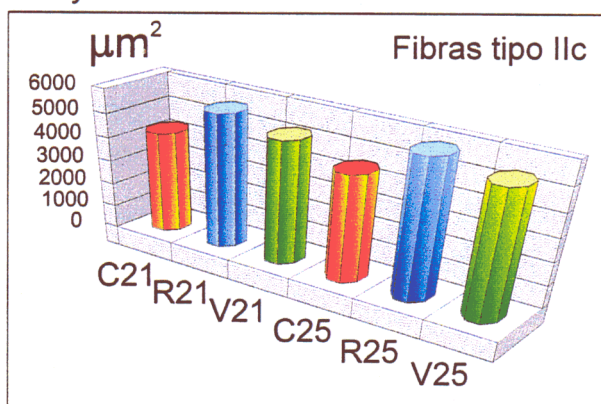
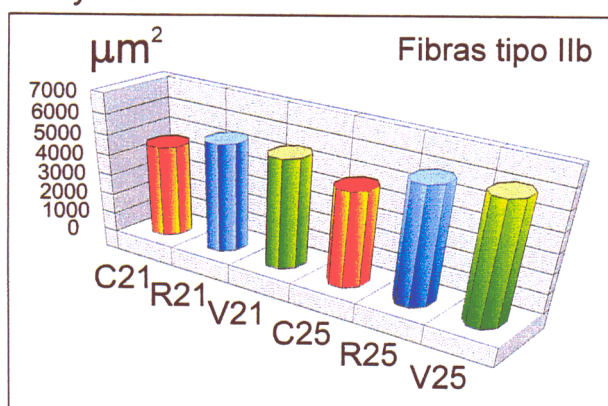


Figura 137.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los grupos control, de resistencia y de velocidad. Fibras tipo IIb. C21, R21, V21, C25, R25 y V25.

Figura 138.- Representación gráfica comparativa de la superficie entre los grupos control, de resistencia y de velocidad. Fibras tipo IIc. C21, R21, V21, C25, R25 y V25.

	Fibras tipo I	Fibras tipo IIa	Fibras tipo IIb	Fibras tipo IIc
C21	4657.0±720.5	5287.3±617.2	4563.1±714.7	4301.1±600.6
C24	4670.9±555.5	5276.8±604.3	4747.6±772.4	4538.7±534.5
R21	5820.6±708.7	5648.5±597.0	5424.7±772.1	5680.6±707.2
V21	4639.7±763.7	5838.5±877.4	5469.0±790.9	5223.0±761.1
R24	5952.1±758.8	5827.4±760.0	5867.9±766.9	5879.2±747.5
V24	5077.0±837.1	7102.3±1144.4	6083.6±922.1	5446.2±807.4

Tabla XIV.- Cuadro resumen comparativo de los resultados obtenidos en el estudio de la superficie media de corte transversal de los diferentes tipos de fibra en cada grupo del protocolo experimental.

12.3.- VARIACIONES DEL VOLUMEN MITOCONDRIAL EN RELACIÓN AL VOLUMEN DE CADA TIPO DE FIBRA.

A continuación analizaremos la proporción volumétrica, entre las mitocondrias y el resto de la fibra, en todos los grupos del protocolo propuesto. Los datos fueron obtenidos a través de cortes seriados de microscopía electrónica y estudiados mediante un analizador de imágenes.

12.3.1.- Fibras tipo I.

En el estudio del volumen mitocondrial relacionado con las fibras tipo I de los grupos controles (C21 y C25), se objetiviza que sí existe una diferencia volumétrica, que es mayor según la edad del individuo y se cuantifica en un 7% a favor de las C25, ($C21-I m=2.9\pm0.5$ y $C25 m=3.1\pm1.0$). Por este hecho la distribución de los grupos computados para el estudio de esta variable, difiere de la variable anterior, y este incremento en el volumen mitocondrial entre los elementos del grupo control, nos obliga a hacer una comparación entre grupos homólogos en el tiempo. ($C25>C21$). (Figura 139).

Cuando se compara el volumen mitocondrial de las fibras tipo I, del grupo C21, con sus semejantes del grupo de resistencia con tres años de práctica deportiva, los datos obtenidos nos muestran claramente que hay una variación positiva, ya que las fibras de R21 poseen una densidad de mitocondrias un 28% más elevado que las C21. Si seguimos el mismo planteamiento entre las fibras equivalentes que pertenecen a los grupos C25 y R25, se registra una diferencia positiva en los atletas de resistencia, incluso mayor que la existente en el grupo anterior, siendo aquí de un 39% a favor de los segundos. ($R21>C21$ y $R25>C25$). (Figura 140).

Con estos mismos criterios, se enfrentan los grupos control y de velocidad y se observa que también aparece una diferencia significativamente positiva a favor de los velocistas, siendo ésta de un 28%. Los cambios aparecidos al comparar los grupo control de mayor edad y los atletas de V25, proporcionan una diferencia a favor de los velocistas que está calculada en un 35%. ($V21>C21$ y $V25>C25$). (Figura 141).

Los cambios cuantitativos de esta variable, durante los tres primeros años de realización de un deporte, ya sea de resistencia (R21) o de velocidad (V21), no muestran una diferencia significativa entre ambos. Lo mismo sucede si las muestras analizadas son las correspondientes a los siete años de práctica deportiva. ($R21=V21$ y $R25=V25$). (Figura 142).

El examen de las muestras pertenecientes a ambos grupos de resistencia (R21 y R25), nos ponen de manifiesto que su porcentaje del volumen mitocondrial, es diferente estadísticamente y también como ocurría en casos anteriores con otros grupos (C21 y C25), guardan una relación que es proporcional al tiempo transcurrido en la practica del deporte. Esta diferencia que es positiva, se decanta hacia las R24 en un porcentaje de alrededor de un 16%. (R21-I $m=3.7\pm0.4$ R25-I $m=4.3\pm0.9$. R25>R21). (Figura 155).

Por último y dentro de las fibras tipo I, los resultados obtenidos en la comparación de los distintos grupos de velocistas (V21 y V25), muestran la existencia de una diferencia que guarda relación con el tiempo que se ha realizado el ejercicio. La tabulación de esta diferencia nos arroja un resultado de un 14% a favor de las V25. (V21-I $m=3.7\pm0.5$ y V25-I $m=4.2\pm1.1$). (V25>V21). (Figura 156)

12.3.2.-Fibras tipo IIa.

Continuando ahora con la misma sistemática empleada hasta el momento, estudiamos la distribución de mitocondrias en las fibras tipo IIa, que por sus características metabólicas, pueden aparecer en menor cantidad que las de tipo I.

Primeramente comparamos los dos grupos controles (C21 y C25), y encontramos que presentan una discrepancia estadísticamente válida (C21-IIa $m=2.7\pm0.5$ y C25-IIa $m=2.2\pm0.7$). Estos datos muestran una diferencia del 19% de la densidad de volumen mitocondrial de las C25, en relación con las C21, es decir, una disminución porcentual del volumen mitocondrial, con el transcurso del tiempo, en personas de vida sedentaria. Como en los casos anteriores y al existir una diferencia significativa entre los dos grupos control, ambos deberán ser tratados estadísticamente como dos muestras distintas y serán enfrentadas con los grupos de deportistas de sus mismas edades. (C21>C25). (Figura143).

Dentro de los cálculos comparativos efectuados entre las C21 y el grupo de los atletas de resistencia, encontramos que no existe una diferencia significativa con los R21. Elegimos ahora el segundo grupo control C25 y lo comparamos con el grupo de atletas de resistencia R25. Vimos de antemano que el porcentaje en volumen mitocondrial de este grupo, es el más pequeño dentro de las fibras de su mismo tipo en todas las series estudiadas. Existiendo por tanto una diferencia con las R25, que será siempre en beneficio de los atletas de resistencia. Dicho aumento es de un 68%. (C21=R21 y C25<<R25). (Figura 144).

A continuación hemos comparado el mismo grupo control C21 y el grupo de velocistas V21. De este análisis se desprende la siguiente consideración: no existe una diferencia entre ambos grupos. Cuando comparamos el grupo control V25 y los atletas de velocidad V25, y teniendo en cuenta lo dicho anteriormente sobre su pequeño porcentaje en mitocondrias, nos encontramos que hay una disparidad con los velocistas de un 50% a favor de éstos. ($V21=C21$ y $V25 \gg C25$). (Figura 145)

Los grupos de resistencia R21 y R25, cuando son investigados bajo los parámetros estadísticos propuestos, nos muestran que son diferentes, y que existe una relación temporal ($R21-IIa$ $m=2.7 \pm 0.5$ y $R25-IIa$ $m=3.7 \pm 1.4$). Se aprecia que hay un incremento del 37% del R25 sobre el R21. ($R25 > R21$). (Figura 155).

Para seguir con la misma sistemática desarrollada hasta ahora realizamos el estudio comparativo de las fibras IIa entre los grupos de velocidad V21 y V25. Dicho análisis nos muestra la existencia de una disparidad entre estos dos grupos ($V21-IIa$ $m=2.7 \pm 0.6$ y $V25-IIa$ $m=3.3 \pm 0.9$). Esta desigualdad la hemos estimado en un incremento de un 22% a favor de las V25. ($V25 > V21$). (Figura 156).

12.3.3.- Fibras tipo IIb.

Ya a simple vista, vemos que este tipo fibrilar es el que menos densidad de volumen de mitocondrias presenta, en relación al resto de los grupos (I, IIa y IIc) y se manifiesta además invariablemente en todos los grupos estudiados (C21, C25, R21, R25, V21 y V25). Seguiremos los mismos patrones de comparación empleados en los casos anteriores, por lo cual se estudiarán en primer lugar los grupos controles entre sí.

Al estudiar los datos que se desprenden de la aplicación del método estadístico en la dos poblaciones control, cabe resaltar que dichos datos nos muestran que en este tipo de fibras, según ha transcurrido el tiempo, aparece una disminución del volumen mitocondrial de un 11%, en la relación entre C21 y C25 ($C21-IIb$ $m=1.8 \pm 0.3$ y $C25-IIb$ $m=1.6 \pm 0.6$). En las fibras tipo IIb del conjunto C25 hemos encontrado el tanto por ciento de volumen mitocondrial más pequeño de todas las series y tipos de fibras estudiados. ($C21 > C25$). (Figura 147).

El análisis del grupo C21, comparado con su correspondiente grupo de atletas de resistencia, presenta una diferencia a favor de éstos de un 17%. Esta diferencia en el volumen mitocondrial es aun mayor, cuando se compara el grupo control con los ciclistas que llevan al menos siete años de práctica deportiva, presentando una

diferencia de volumen de un 50% más en estos últimos. ($R21 > C21$ y $R25 >> C25$). (Figuras 148).

A continuación se procedió a realizar la comparación de este mismo parámetro, entre los grupos C21 y los atletas de velocidad con tres años de antigüedad, apareciendo aquí un pequeño incremento para las V21 de un 6%, pero no por eso menos importante. El enfrentamiento de los datos obtenidos en el análisis de los grupos C25 y V25, proporcionan una diferencia mucho más manifiesta, con un 44% más en el volumen de mitocondrias en este tipo de fibras, en los velocistas. ($V21 > C21$ y $V21 >> C25$). (Figura 149).

El siguiente paso consistió en el análisis por separado de los dos grupos de resistencia (R21 y R25) con cada uno de los grupos de velocidad (V21 y V25). Cuando la población estudiada fue la de los grupos de menor edad, la valoración alcanzada muestra que los atletas de velocidad presentan el volumen mitocondrial un 10% inferior que los de resistencia. Cuando se enfrentan el grupo R25 con el de velocidad V25, no existe discrepancia entre ellas. ($R21 > V21$ y $R25 = V25$). (Figura 150).

Analizamos ahora las series pertenecientes a los grupos de resistencia (R21 y R25) entre sí, y apreciamos que había un incremento en dicha relación ($R21 - IIb m = 2.1 \pm 0.5$ y $R25 - IIb m = 2.4 \pm 1.1$) y que ésta era proporcional al tiempo de realización de la práctica deportiva. Dicho incremento era de un 14% a favor de la R25. ($R25 > R21$). (Figura 155).

Para acabar con este grupo de fibras, los resultados obtenidos al cotejar los grupos de velocidad V21 y V25 entre sí, mostraron la existencia de un aumento significativo ($V21 - IIb m = 1.9 \pm 0.2$ y $V25 - IIb m = 2.3 \pm 0.7$), a favor de los corredores que han dedicado más tiempo a la práctica deportiva, que correspondió a un 21%. ($V25 > V21$). (Figura 156).

12.3.4.- Fibras tipo IIc.

A continuación y ya en último lugar de estos resultados, nos queda por analizar los datos obtenidos en la comparación porcentual del volumen mitocondrias para las fibras tipo IIc en todos los grupos del protocolo.

Los primeros en compararse entre sí, fueron los pertenecientes a los grupos controles (C21 y C25). De dicho estudio se desprende que no hay una diferencia estadística entre ambas series ($C21 - IIc m = 3.2 \pm 0.8$ y $C25 - IIc m = 3.2 \pm 1.5$), por lo cual

para posteriores estudios pueden considerarse o no, como una sola serie. ($C21=C25$). (Figura 151).

Cuando se estudian la serie anteriormente citada, y los grupos de resistencia ($R21$ y $R25$), observamos que en este caso sí se aprecia estadísticamente la existencia de una discrepancia, tanto en relación con la $R21$ como con la $R25$. Dicha diferencia es siempre positiva a favor de estos deportistas, y es tanto más favorable cuanto mayor es el tiempo de dedicación al deporte. Este incremento es de un 25% para las $R21$ y de un 44% para las $R25$. ($R21>C21$ y $R25>C25$). (Figura 152).

Si las que comparamos en este paso siguiente, son las series controles y las series de los velocistas ($V21$ y $V25$), se aprecia que no existe en este caso ninguna diferencia entre estas series. De lo cual se deduce, que las únicas que sufren incremento entre todas las series serían las pertenecientes a los atletas de resistencia. ($V21=C21$ y $V25=C25$). (Figura 153).

La comparación de los grupos de resistencia ($R21$ y $R25$) con los grupos de velocidad ($V21$ y $V25$), se basa en los datos obtenidos en el estudio anterior, haciendo el estudio de este apartado innecesario, ya que nos arrojaría los mismos resultados que cuando comparamos los controles ($C21$ y $C25$) son los de resistencia. Dicha diferencia siempre a favor de los $R21$ y $R25$ es de un 25% y 44% respectivamente. ($R21>V21$ y $R25>V25$). (Figura 154).

Al valorar la diferencia de densidad mitocondrial entre los dos grupos de ciclistas, vemos que sigue una curva ascendente, a favor de aquellos que han dedicado un tiempo más prolongado al deporte ($R21$ -Ilc $m=4.0\pm0.6$ y $R25$ -Ilc $m=4.6\pm1.0$), con un incremento del 15% a favor de $R25$. ($R25>R21$). (Figura 155).

Como ya adelantamos anteriormente, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambas muestras ($V21$ -Ilc $m=3.3\pm0.7$ y $V25$ -Ilc $m=3.2\pm1.4$). ($V21=V25$). (Figura 156).

Todos estos datos podemos repasarlos de forma resumida en las figuras 157 a 160, y en la tabla XV, así como en las imágenes equivalentes a este estudio, obtenido a partir de datos ultraestructurales, ahora en su vertiente histoquímica. (Figura 161).

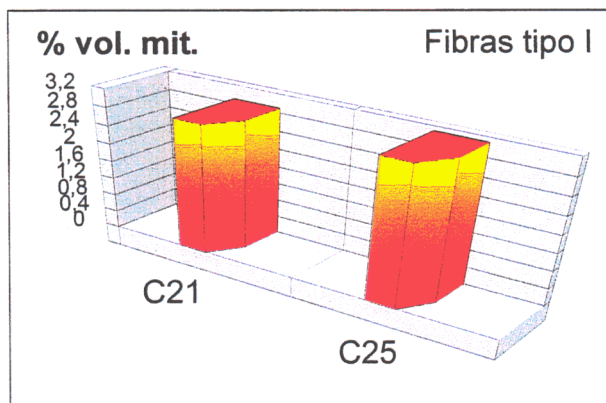


Figura 139.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los distintos grupos control. Fibras tipo I. C21 y C25.

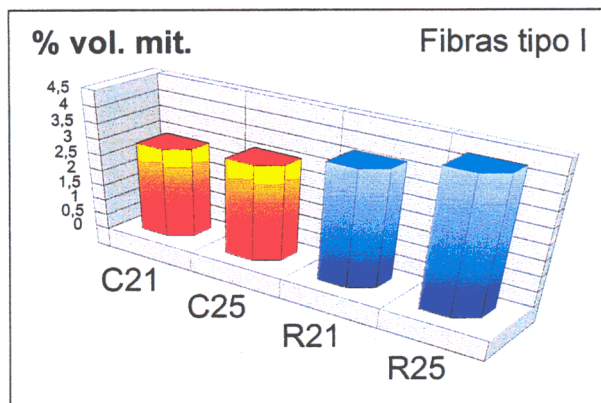


Figura 140.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los grupos control y los de resistencia. Fibras tipo I. C21, C25, R21 y R25.

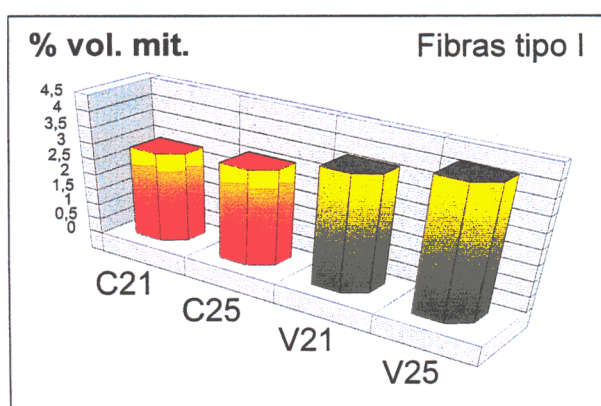


Figura 141.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los grupos control y los de velocidad. Fibras tipo I. C21, C25, V21 y V25.

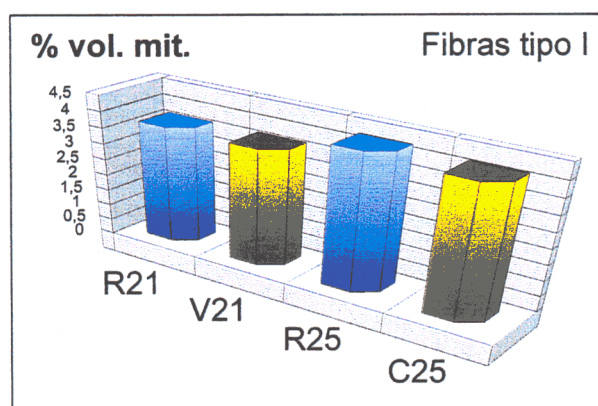


Figura 142.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los grupos de resistencia y los de velocidad. Fibras tipo I. R21, V21, R25 y V25.

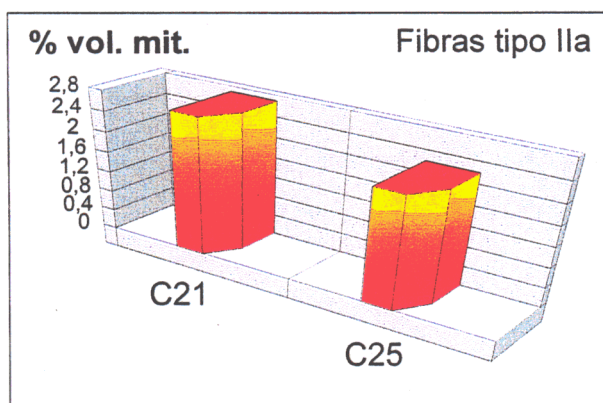


Figura 143.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los distintos grupos control. Fibras tipo IIa. C21 y C25.

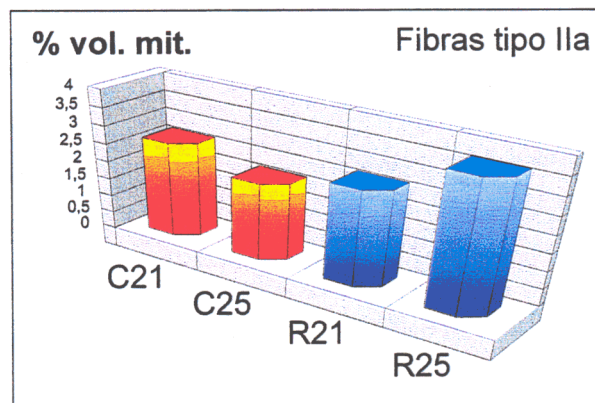


Figura 144.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los grupos control y los de resistencia. Fibras tipo IIa. C21, C25, R21 y R25.

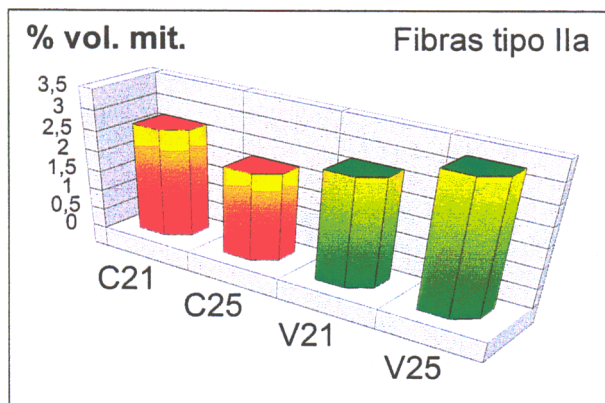


Figura 145.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los grupos control y los de velocidad. Fibras tipo IIa. C21, C25, V21 y V25.

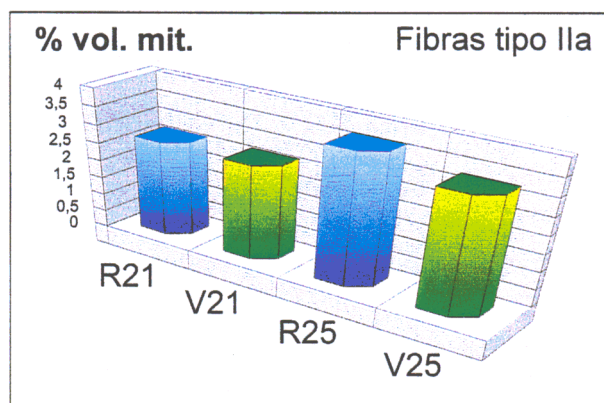


Figura 146.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los grupos de resistencia y los de velocidad. Fibras tipo IIa. R21, V21, R25 y V25.

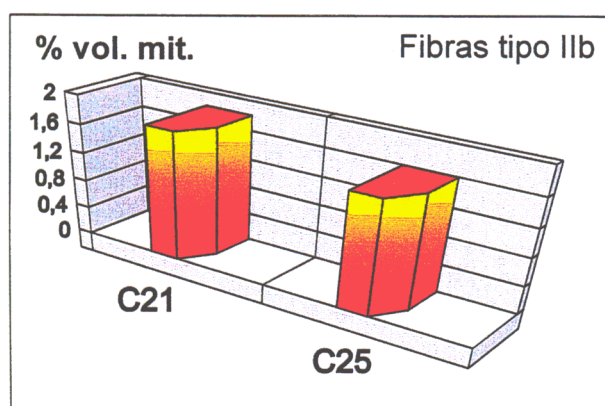


Figura 147.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los distintos grupos control. Fibras tipo IIb. C21 y C25.

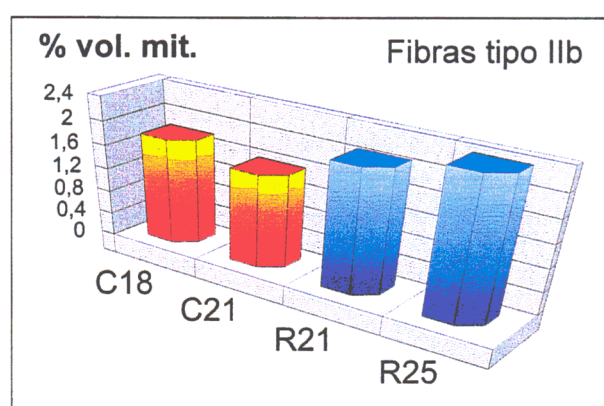


Figura 148.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los grupos control y los de resistencia. Fibras tipo lib. C21, C25, R21 y R25.

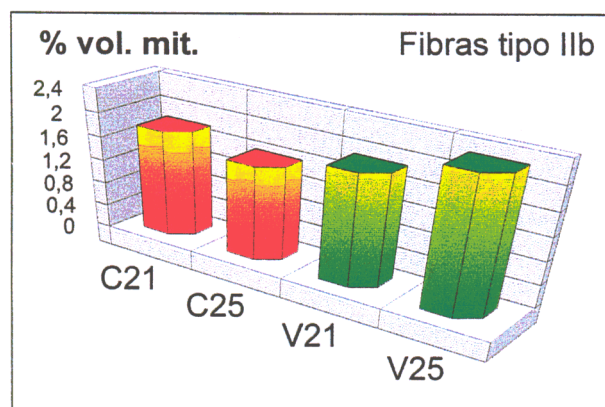


Figura 149.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los grupos control y los de velocidad. Fibras tipo IIb. C21, C25, V21 y V25.

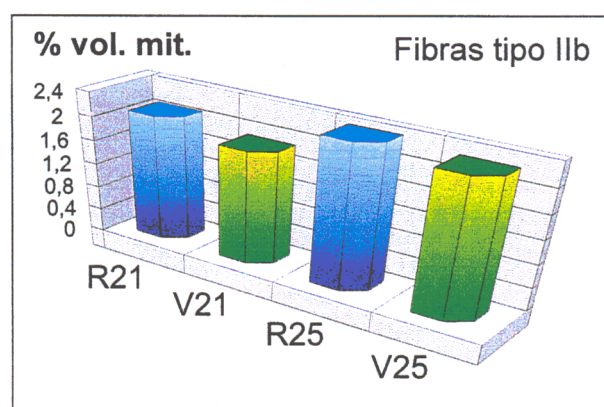


Figura 150.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los grupos de resistencia y los de velocidad. Fibras tipo IIb. R21, V21, R25 y V25.

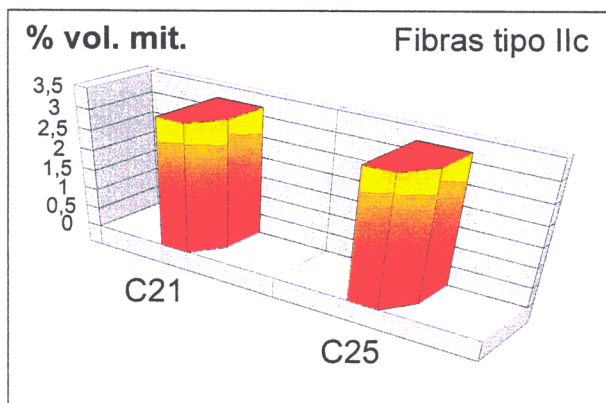


Figura 151.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los distintos grupos control. Fibras tipo IIc. C21 y C25.

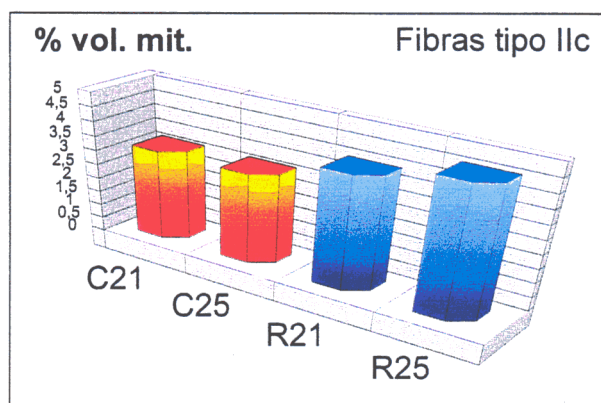


Figura 152.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los grupos control y los de resistencia. Fibras tipo IIc. C21, C25, R21 y R25.

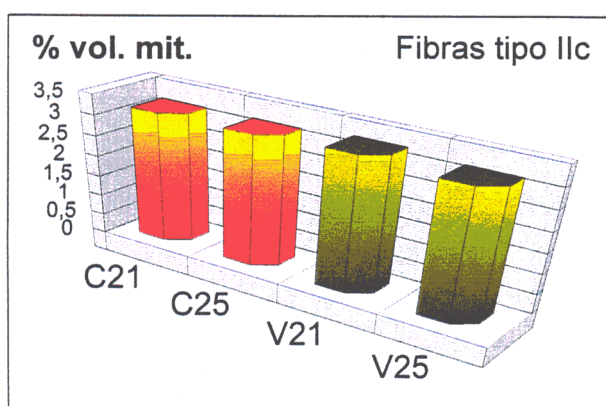


Figura 153.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los grupos control y los de velocidad. Fibras tipo IIc. C21, C25, V21 y V25.

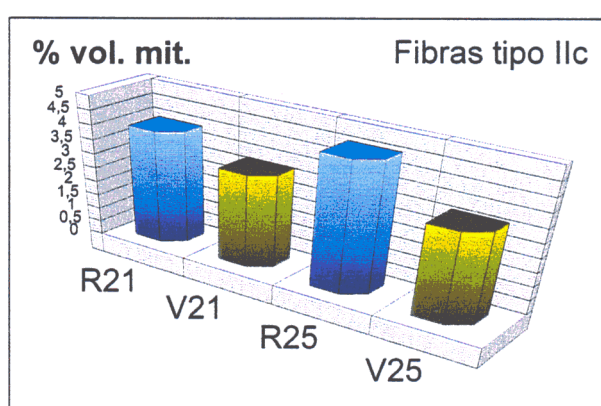


Figura 154.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los grupos de resistencia y los de velocidad. Fibras tipo IIc. R21, V21, R25 y V25.

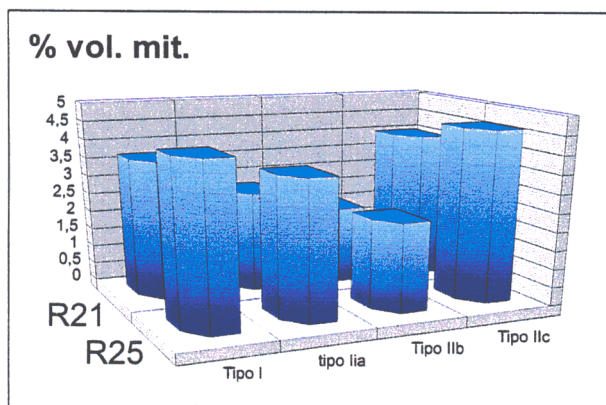


Figura 155.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los grupos de resistencia en función del tipo de fibra. Fibras tipo I, Ila, I Ib y IIc. R21 y R25.

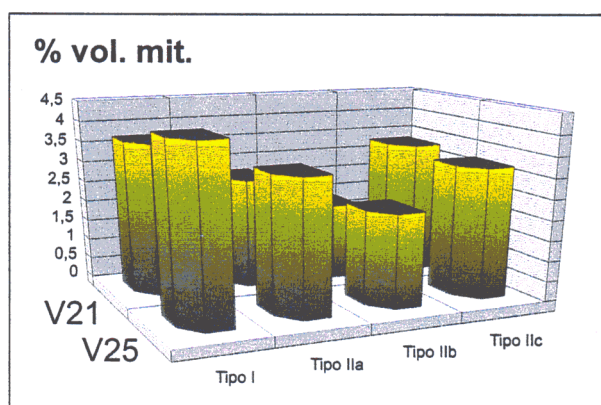


Figura 156.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los grupos de velocidad en función del tipo de fibra. Fibras tipo I, Ila, I Ib y IIc. V21 y V25.

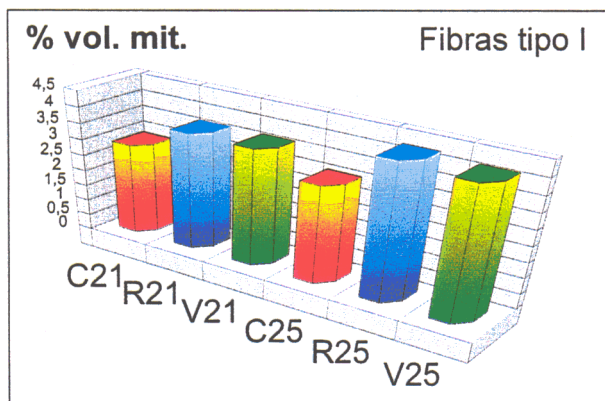


Figura 157.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los grupos control, resistencia y velocidad. Fibras tipo I. C21, R21, V21, C25, R25 y V25.

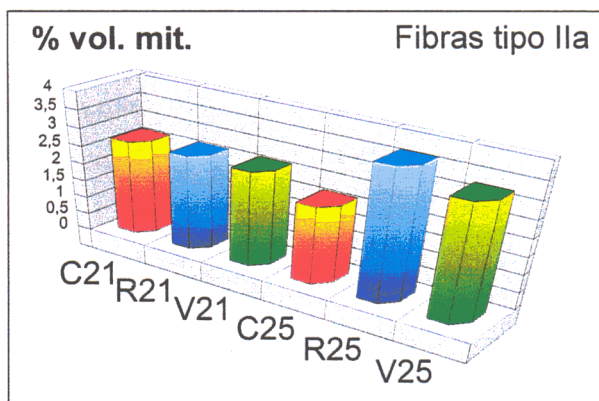


Figura 158.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los grupos control, resistencia y velocidad. Fibras tipo IIa. C21, R21, V21, C25, R25 y V25.

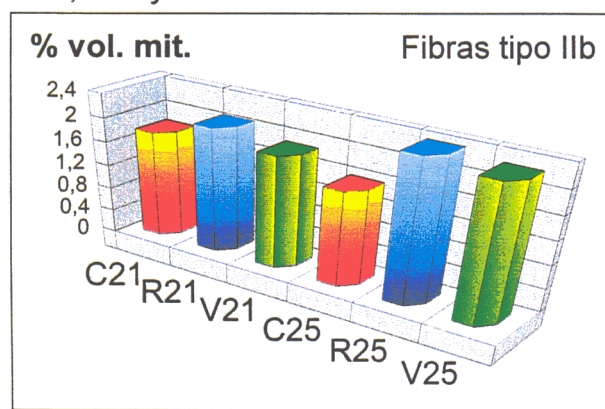


Figura 159.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los grupos control, resistencia y velocidad. Fibras tipo IIb. C21, R21, V21, C25, R25 y V25.

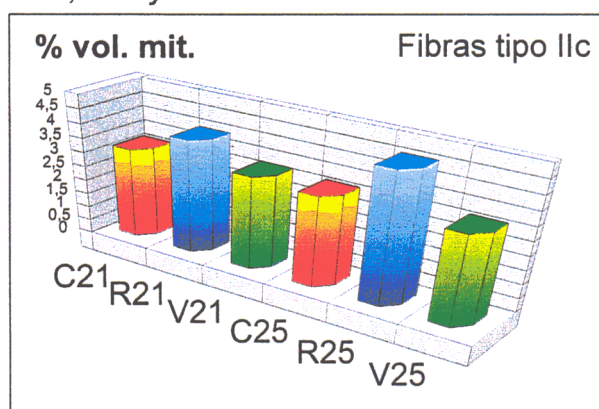


Figura 160.- Representación gráfica comparativa del volumen mitocondrial entre los grupos control, resistencia y velocidad. Fibras tipo IIc. C21, R21, V21, C25, R25 y V25.

	Fibras tipo I	Fibras tipo IIa	Fibras tipo IIb	Fibras tipo IIc
C21	2.9±0.5	2.7±0.5	1.8±0.3	3.2±0.8
C24	3.1±1.0	2.2±0.7	1.6±0.6	3.2±1.5
R21	3.7±0.4	2.7±0.5	2.1±0.5	4.0±0.6
V21	3.7±0.5	2.7±0.6	1.9±0.2	3.3±0.7
R24	4.3±0.9	3.7±1.4	2.4±1.1	4.6±1.0
V24	4.2±1.1	3.3±0.9	2.3±0.7	3.2±1.4

Tabla XV.- Cuadro resumen comparativo de los resultados obtenidos en el estudio cuantitativo de las variaciones del volumen mitocondrial en relación al volumen fibrilar de los diferentes tipos de fibra en cada grupo del protocolo experimental.

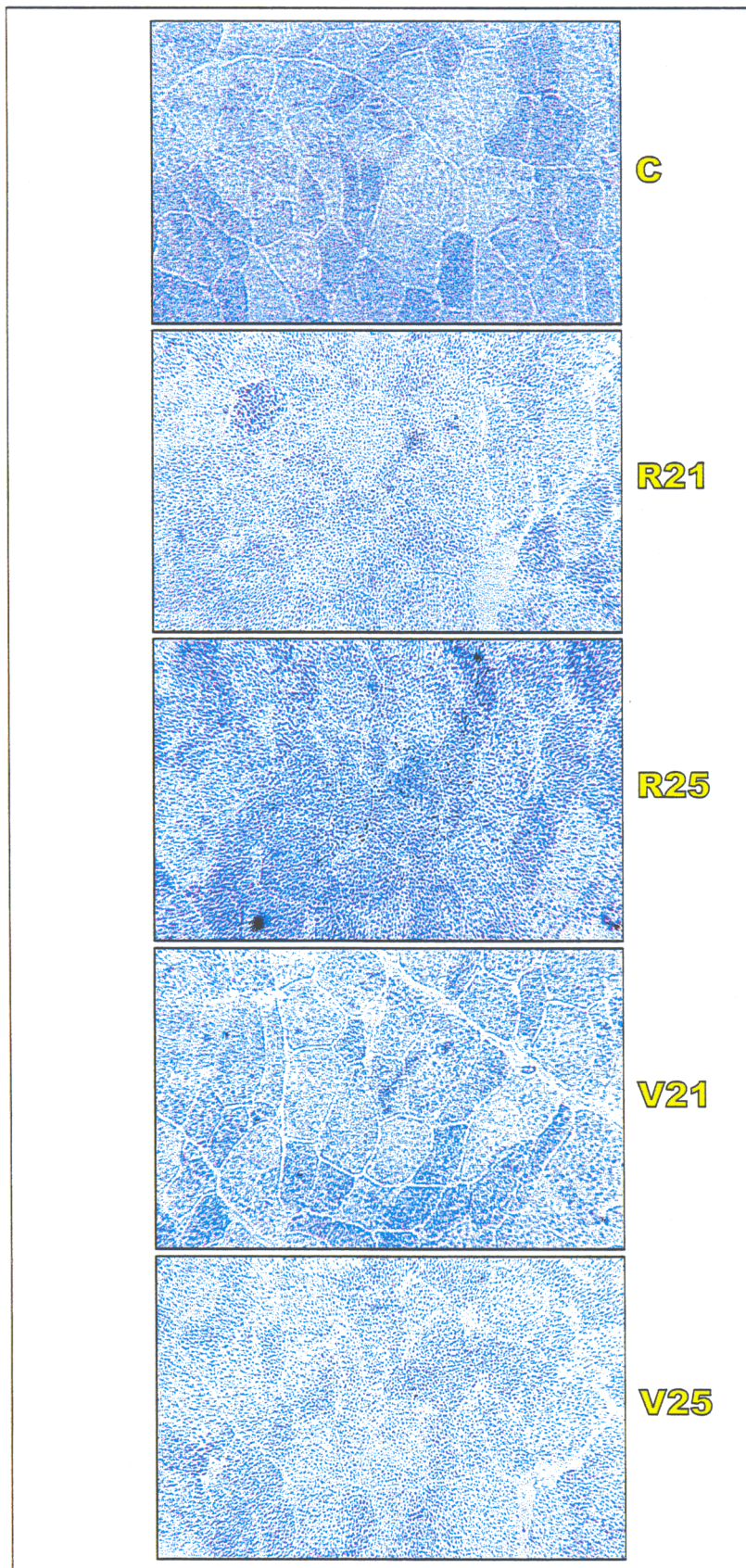


Figura 161.- Corte transversal de tejido muscular. Se observa la diferente proporción de concentración mitocondrial en cada grupo experimental. SDH. 400x.

12.4.- ESTUDIO CUANTITATIVO DE LAS VARIACIONES EN EL NÚMERO DE CAPILARES EN LOS DIFERENTES GRUPOS DEL PROTOCOLO.

El último de los parámetros que vamos a considerar, tiene la característica de ser extracelular, por lo que las variaciones según el tipo de fibra en cada grupo del protocolo propuesto, solo serían estadísticamente interpretables, si todas las fibras que rodean a cada capilar fuesen del mismo tipo, es decir, si el músculo fuese de contracción rápida o contracción lenta. Pero en nuestro caso, es un músculo mixto y cada capilar puede estar rodeado de cualquiera de los tipos de fibras que presenta, por lo que solo vamos a considerar sus variaciones en relación al cambio total en cada uno de los grupos propuestos en el protocolo experimental.

El número de capilares detectados por mm^2 de superficie de corte transversal, en los distintos cortes de tejido muscular pertenecientes a los grupos controles (C21 y C25) no presentaban entre sí una diferencia significativa (C21 $m=277.1 \pm 82.5$ y C25 $m=300.2 \pm 96.0$), por tanto para posteriores comparaciones pueden considerarse como dos grandes grupos o como uno solo. (C21=C25). (Figuras 167 y 168).

En segundo termino, si comparamos los grupos control (C21-C25) con los grupos de resistencia (R21 y R25), se objetiviza claramente que en este caso sí existe una desigualdad en las muestras estudiadas, que se acentúa durante el transcurso de la practica deportiva. Este incremento observado va siempre a favor de los grupos R21 y R25 y se puede estimar en 50% y 104% respectivamente, (R21>C21 y R25>>C25). (Figuras 162 y 168).

Cuando comparamos los grupos control (C21-C25) con los grupos pertenecientes a los atletas de velocidad (V21 y V25), se pone de manifiesto como en el caso anterior que existe un incremento vascular significativo, pero este cambio se realiza en los tres primeros años y en el transcurso de los cuatro años siguientes, la diferencia no es valorable. Dicho incremento en el número de capilares/ mm^2 de V21, es de un 95%, (V21>C21 y V25=C25). (Figuras 163 y 168).

En la comparación de la vascularización de las fibras musculares de atletas de resistencia con los de velocidad, hemos visto por los datos obtenidos, que en los tres primeros años de la practica del ejercicio, existe un claro aumento de capilares por mm^2 en los velocistas. Esta diferencia podemos valorarla en un 29%. Cuando ya han transcurrido seis años de la practica deportiva, apreciamos que la diferencia invierte su sentido y existe un incremento a favor de los de resistencia (R25) de un 4% en relación con los velocistas (V25) (R21<V21 y R25>V25). (Figuras 164 y 168).

Si el estudio estadístico lo efectuamos comparando las dos poblaciones de atletas de resistencia, los datos que encontramos ((R21 $m=435.0\pm77.6$ y R25 $m=589.5\pm55.5$), nos ponen de manifiesto que existe una diferencia constatable a medida que transcurre el tiempo. Este incremento de R25 en relación con las R21 es del 36%, (R25>R21). (Figuras 165 y 168).

Por último, igual que en el estudio que realizamos al comparar el grupo control, se desprende que las dos muestras de los velocistas, no presentan entre sí una divergencia, poniéndose de manifiesto en los valores obtenidos (V21 $m=562.7\pm78.5$ y V25 $m=566.2\pm87.3$). El crecimiento que experimenta el lecho vascular es prácticamente despreciable, si lo comparamos con las primeras etapas. (V21 = V25). (Figuras 166 y 168).

Todos estos datos son expuestos esquemáticamente en la tabla número XVI y en las figuras 167 y 168).

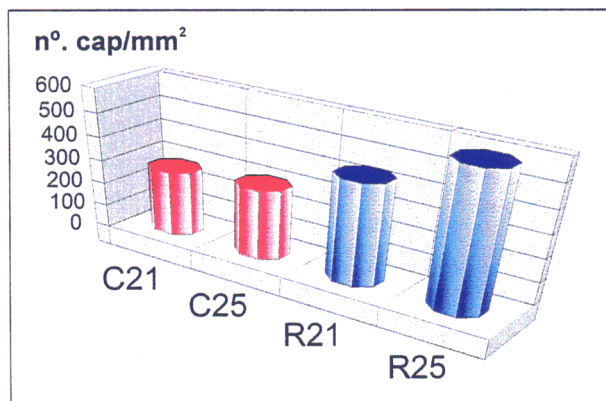


Figura 162.- Representación gráfica comparativa de la concentración vascular entre los grupos control y los de resistencia. C21, C25, R21 y R25.

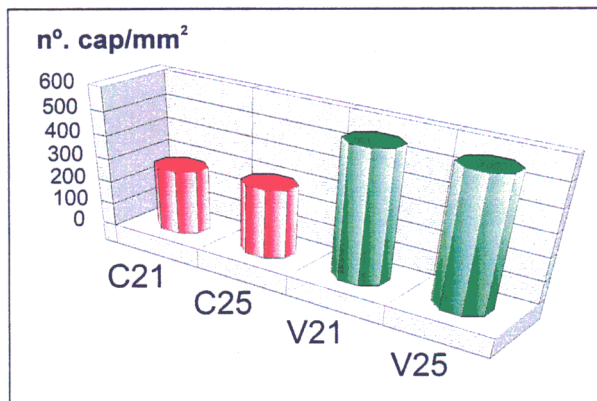


Figura 163.- Representación gráfica comparativa de la concentración vascular entre los grupos control y los de velocidad. C21, C25, V21 y V25.

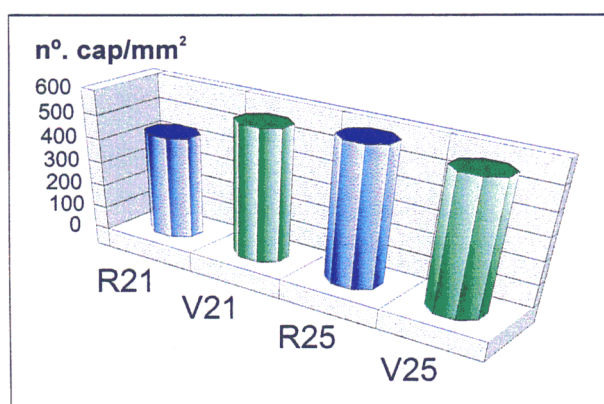


Figura 164.- Representación gráfica comparativa de la concentración vascular entre los grupos de resistencia y los de velocidad. R21, V21, R25 y V25.

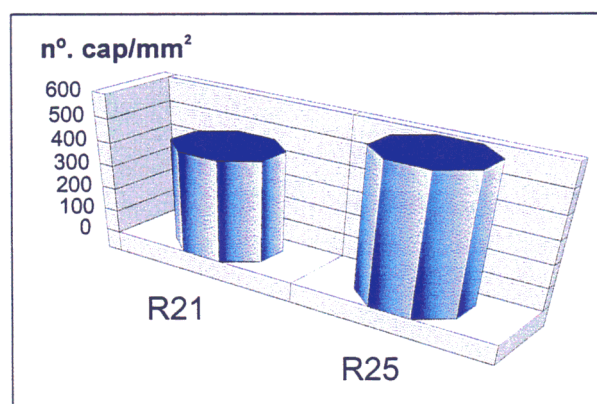


Figura 165.- Representación gráfica comparativa de la concentración vascular entre los distintos grupos de resistencia. R21 y R25.

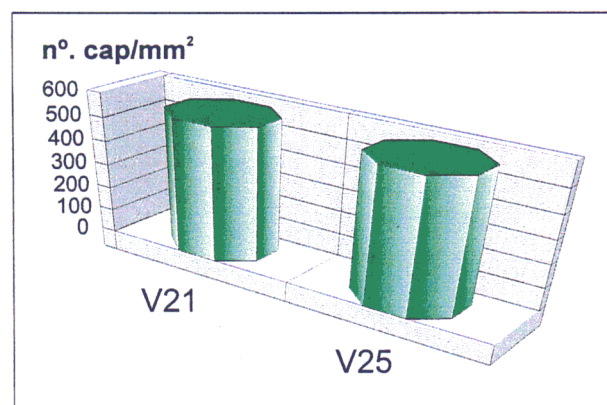


Figura 166.- Representación gráfica comparativa de la concentración vascular entre los distintos grupos de velocidad. V21 y V25.

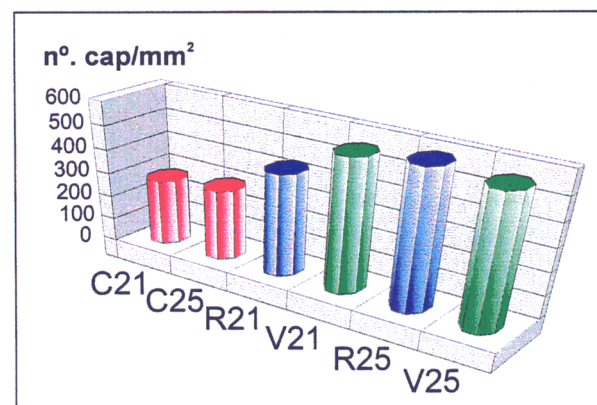


Figura 167.- Representación gráfica comparativa de la concentración vascular entre los grupos control, de resistencia y de velocidad. C21, C25, R21, V21, R25 y V25.

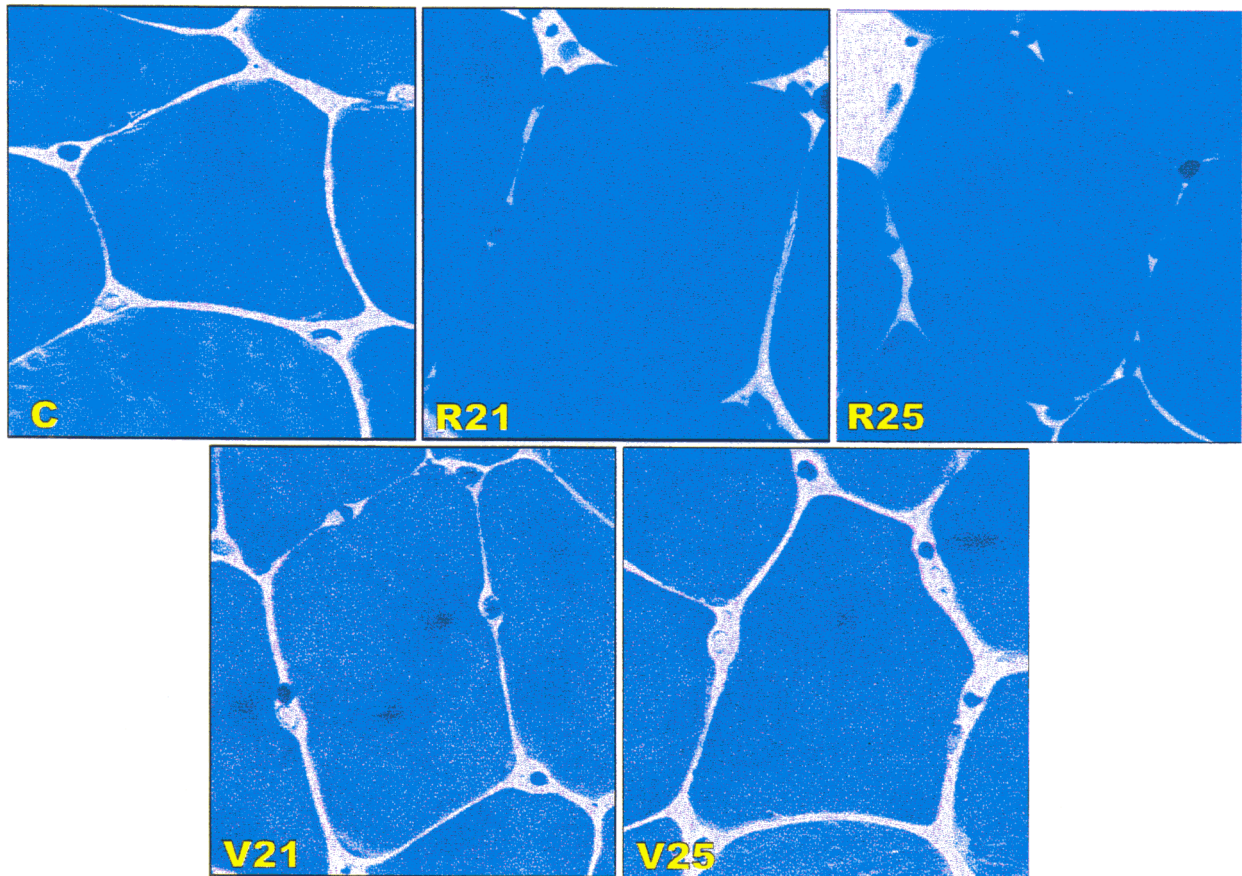


Figura 168.- Cortes semifinos transversales de tejido muscular de cada uno de los grupos experimentales, donde se aprecia la diferente densidad vascular. Azul de toluidina. 1000x.

	Capilares/mm ²
C21	277.1±82.5
C24	300.2±96.0
R21	435.0±77.6
V21	562.7±78.5
R24	589.5±55.5
V24	566.2±87.3

Tabla XVI.- Cuadro resumen comparativo de los resultados obtenidos en el estudio cuantitativo del n° de capilares por unidad de superficie de corte transversal en los diferentes grupos experimentales.

D i s c u s i ó n

13.- VALORACIÓN DEL MÉTODO UTILIZADO.

13.1.- EXTRACCIÓN DE MUESTRAS.

El primer aspecto a considerar en esta discusión es la utilidad del método empleado en la obtención de las muestras de tejido. Cuando se presenta la necesidad de estudiar un tejido tan accesible como el muscular, ya sea desde el punto de vista de la investigación, como del diagnóstico de diferentes patologías, el perfeccionamiento de los instrumentos de toma de muestras, ha sido fundamental para conseguir evitar al donante, el mayor número de molestias.

En este sentido, creemos que la biopsia muscular con aguja es, a todos los niveles, un gran adelanto, sobre la toma abierta. Como procedimiento no es en absoluto traumático y por supuesto, es indoloro, como hemos podido comprobar con las extracciones a nuestros grupos de estudiantes y deportistas. También el tiempo invertido en realizar la toma de muestras es bastante reducido, no superando los 15 minutos. Al ser la incisión tan pequeña, el paciente puede movilizarse inmediatamente. Este punto de vista ha sido compartido por numerosos autores, desde los inicios de este modo de proceder, como podemos constatar en las publicaciones de Edwards y cols. (1977), Kirby y cols. (1982) y Pampheltt y cols. (1985).

En la clínica es muy útil para biopsia muscular con fines diagnósticos en pacientes problemáticos. Diliberty y cols. (1983) han biopsiado a 77 niños para la valoración de alteraciones neuromusculares, sin que se presentase ninguna complicación. Boltshauser (1986) apunta la conveniencia de aplicar esta técnica de biopsia con aguja, como método de elección en algunas personas, en las que la técnica abierta es discutida (niños, obesos, enfermos con alteraciones cardíacas), mientras que en otros casos, cuando debe visualizarse exactamente la zona del músculo en la que se va a tomar la muestra, no hay más remedio que recurrir a la técnica abierta.

En cuanto a la posibilidad de complicaciones, el análisis también es favorable a este método. En primer lugar se reduce considerablemente la posibilidad de infecciones al ser la incisión mínima. La producción de hematomas en la casuística de Hultmann (1967) se reduce al 4 por mil y Edwards (1973) en 120 biopsias no detecta ningún hematoma. Bergström (1975) en 5000 biopsias, solamente en una ocasión requirió una intervención para detener una hemorragia arterial. Aunque Kirby (1982) utilizando ultrasonidos, demuestra que los hematomas pequeños en la zona de la biopsia son más frecuentes de lo que se refiere sin esta comprobación. En nuestra estadística no hemos encontrado ninguna complicación. Únicamente una ligera molestia en la contracción del

músculo en el transcurso de las primeras 48 horas, en un número reducido de donantes, preferentemente del grupo control, que no influyó en su actividad normal.

Por otra parte, el resultado del estudio histológico no varía sea cual sea la técnica que utilicemos, como ya demostró Dubowitz en 1977, porque el tamaño de la muestra obtenida es suficiente para llevar a cabo una gran batería de técnicas, encaminadas a estudios morfológicos, histoquímicos o bioquímicos (Diliberty y cols. 1983, Boltshauser 1986). Al reducirse el tiempo de manipulación de la muestra desde la incisión hasta la inmersión en fijadores o la congelación, se obtienen datos más precisos en los resultados a todos los niveles. Su sencillez ha permitido aplicarlo en el deporte, para un mejor conocimiento de la relación morfología-función de las células de este tejido, llegando incluso a poder realizar la toma de muestras durante los entrenamientos (Sjöström y cols., 1982b), para estudios detallados de momentos metabólicos concretos.

13.2.- DETERMINACIÓN DE TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS.

En segundo lugar debemos considerar la validez del estudio enzimático, que tanta controversia ha despertado entre los diferentes y numerosos autores. La elección de las técnicas la caracterización de cada tipo de fibra se ha convertido en los últimos años en uno de los principales puntos de discusión, precisamente por la gran variedad de las que disponemos.

El músculo esquelético en las especies de mamíferos representa a una heterogénea población celular, con fibras que tienen una diversidad individualizada en características fisiológicas (Close, 1972; Bershitsky y cols., 1997), bioquímicas (Peter y cols., 1972; Vigoreaux, 1994), histoquímicas (Khan, 1976; Santana-Pereira y cols., 1995), inmunohistoquímicas (Hoh y cols., 1978; Schiaffino y Reggiani, 1996) y ultraestructurales (Eisenberg y Kuda, 1976; Ogata y Yamasaki, 1985). Estas diferencias se han utilizado para separar las fibras musculares en grupos o tipos de características similares.

Pero, normalmente, los tejidos procesados para microscopía electrónica son inservibles para valoración histoquímica y viceversa. Sin embargo cuando se plantea un ensayo histológico, se puede llevar a cabo un fraccionamiento del tejido previamente programado. La biopsia muestra, paquetes poligonales de fibras musculares organizadas en fascículos bien definidos, de forma que secciones contiguas, en las que es fácil localizar la misma disposición de una serie de fibras, se puede fijar para diferentes métodos, proveyendo una correlación directa, tanto histoquímica como electrónica, mucho más útil para la interpretación de resultados.

La elección de la batería de pruebas histoquímicas es esencial para que la clasificación obtenida a partir de ella sea absolutamente significativa, de forma que si solo utilizamos la demostración del sustrato citoplásmico ATPasa, incluso a diferente pH (Brooke y Kaiser, 1970), la interpretación de datos obtenidos con reacción intermedia puede desvirtuar los resultados. Pero si estas técnicas se complementan con la caracterización de otros sustratos definitorios del tipo de fibra (NADH-TR, SDH, etc.), se puede hacer el estudio comparativo entre todas las técnicas, que nos va a permitir eliminar los falsos positivos y negativos.

A esto se suma la clasificación más reciente expuesta por Staron y Johnson (1993) en la que proponen la inclusión de fibras tipo Ic, IIac y IIab como elementos individualizados. Los conocimientos actuales apuntan al concepto de continuidad bioquímica, según el cual, los músculos pueden expresar diferente proporción de isoformas dentro de una misma célula (Billeter y cols., 1980; Staron e Hikida, 1992) cuando están en periodo de crecimiento activo fisiológico, o cuando se le somete a una actividad dinámica diferente a la que venía desarrollando. Por lo tanto, fibras que en un corte, pueden dar reacción claramente positiva para una enzima, se supone que puede hacerse menos positivas en cortes sucesivos y distorsionar los resultados, pudiendo evitarse con estas técnicas cruzadas, ya que los cambios en la composición de las miofibrillas, no siempre son contemporáneos con los cambios en su metabolismo.

En nuestro caso, las muestras se obtienen en momentos en los que cualquier cambio en la expresión de isomiosinas ha podido ocurrir ya o estar produciéndose, porque no se sabe el tiempo que tarda en instaurarse estas modificaciones. Por eso es necesaria la utilización de otras técnicas que demuestren sustratos glicolíticos y mitocondriales cuyas variaciones en los diferentes tipos de fibras también son muy constantes, para el mismo tipo de ejercicio (Ingjer, 1979; Staron, 1983). Los cambios glicolíticos y oxidativos que acompañan las variaciones en la dotación mitocondrial concuerda plenamente con la capacidad oxidativa de cada tipo de fibra, pero además Cogswell y cols. (1993) vieron que la citocromo oxidasa aumenta más específicamente (un 20%) en las mitocondrias intermiofibrilares, mientras que la SDH presenta las mayores variaciones en las subsarcolémicas (un 40%). La comparación de estos datos con el resto de enzimas propuestas, y con las imágenes obtenidas con microscopía electrónica de transmisión, no dejan lugar a dudas sobre la bondad de los resultados obtenidos.

Si a esto añadimos la demostración por Santana-Pereira y cols. (1995) de la especificidad común entre la ATPasa miofibrilar y los MoAb anti MHC humana, no tenemos dudas ya en afirmar que los objetivos que queremos llevar a cabo no necesitan

esencialmente el empleo de técnicas inmunocitoquímicas para confirmar el detallado y amplio estudio histoquímico.

13.3.- VALORACIÓN DEL ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.

El análisis morfométrico en cuanto al planteamiento matemático que determina el área de corte de fibra debe superar dos obstáculos. Por un lado, la manipulación técnica deshidrata en parte el tejido y sus dimensiones pueden variar con la realidad. De hecho Holly y cols. (1980) valoraron la disminución del área hasta en un 33%. Sin embargo, debemos tener en cuenta que nosotros estamos estudiando un cambio en los tipos de fibras, utilizando el mismo sistema de obtención de muestras y procesamiento en todas ellas, por lo que la posible diferencia apuntada, al afectar a todas por igual, no varía el resultado final obtenido.

El otro punto es que aunque en el grupo control, al estar las fibras menos comprimidas, tiendan a una superficie de corte que se pueda estimar como circunferencial, en los atletas varía el área transversal de cada fibra y las presiones de unas sobre otras, determinan formas poligonales. Por lo tanto, no se puede aplicar directamente la medida de un solo diámetro para calcular el área, como utilizan numerosos autores, teniendo que ser analizados varios puntos perimetrales en cada fibra, para que el estudio sea correcto (Aniansson y cols. 1981).

La validez de los datos obtenidos en relación con el volumen mitocondrial, a partir de muestras de muestras procesadas para MET, no deja lugar a dudas, porque el procedimiento matemático de estudio estereológico propuesto por Weibel en 1966 y 1979, es el que en la actualidad está admitido como más exacto, y es seguido por todos los investigadores con un planteamiento similar al nuestro.

14.- VALORACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y ULTRAESTRUCTURALES EN CADA TIPO DE FIBRA.

Durante mucho tiempo se ha estudiado la estructura de la fibra muscular estriada esquelética y su función como si de una sola célula se tratara. Poco a poco, al ir profundizando en pequeños detalles, se ha ido viendo que lo mismo la morfología, que la forma de llevar a cabo su trabajo, difiere de unos músculos a otros y dentro de un mismo músculo, cada célula presenta características estructurales que consiguen un mejor acondicionamiento para una forma de contracción u otra. En la actualidad se sabe que estas diferencias proporcionan a la población celular que estamos estudiando, una capacidad de realización del trabajo mecánico, muy superior a la que se había apuntado

y, su origen, desarrollo y adaptabilidad, son mucho más complejas de lo que podría haberse imaginado.

En la parte de nuestro estudio dedicada a la ultraestructura de la fibra muscular en los grupos del protocolo experimental, constatamos sin lugar a dudas las diferencias morfológicas características de cada tipo de fibras, que permitan su inclusión entre las de contracción rápida o lenta, y una vez caracterizadas, nos van a permitir estudiar las variaciones morfológicas que ha impuesto sobre ellas el ejercicio físico en función de la modalidad elegida y del tiempo dedicado a su realización.

14.1.- VARIACIONES EN LA SUPERFICIE DE CORTE TRANSVERSAL.

Siguiendo este planteamiento, vemos en primer lugar cómo la superficie de corte transversal es diferente ya en una primera impresión entre unos grupos y otros, de forma que las fibras musculares que predominan en el grupo control, que por sus características morfológicas y por su comparación con técnicas enzimáticas, corresponden a las tipo I, tienen un diámetro bastante constante, mientras que las tipo II, varían más entre ellas, siendo mayores las IIa y IIb que las clasificadas por Ogata y Murata (1969) como intermedias y que en nuestra clasificación corresponden a las IIc. Estos datos concuerdan con los aportados por Jennekens y cols. (1971).

A pesar de que desde el primer momento hemos dicho que no se suelen utilizar como dato característico para un estudio clínico, sí es útil como primer rasgo avalorar en la calidad de un entrenamiento para una actividad deportiva concreta, como es nuestro caso. Esta primera impresión va encaminada a precisar la validez o no de los diferentes grupos de deportistas de nuestro protocolo.

Así observamos ya en la visión general que proporcionan los cortes semifinos, comparados con los correspondientes de histoquímica, cómo en los grupos de resistencia, hay un aumento en el número de fibras con características tipo I, con respecto al grupo control. A la vez aumentan la diversidad de sus diámetros en el corte transversal, es decir, las hay mayores que en el grupo control, pero también otras más delgadas, aunque como ya veremos en el estudio cuantitativo, la superficie media de corte transversal ha aumentado. Lo mismo ocurre con el resto de las fibras, aumentando también algo en número las IIc, en las que además se detecta un incremento en su superficie de corte, ocurriendo lo mismo en las tipo IIa y IIb, pero el número total de éstas ha disminuido.

En el grupo de atletas de velocidad, sin embargo, el mayor aumento en número y proporción afecta a poblaciones compatibles morfológicamente con fibras tipo II, de contracción rápida, mientras que las tipo I y las intermedias, disminuyen en comparación con los controles. La variación en dimensiones dentro de cada tipo es amplia, mucho más que la apuntada por los autores que hacen una valoración (Edström y Ekblom, 1972; McDougall y cols., 1979; Bell y Jacobs, 1990), sin establecer previamente el tipo de actividad que realiza el donante de la muestra.

De esta primera impresión puede deducirse que hay un aumento de tamaño del músculo, justificable tanto por aumento en el número de fibras musculares que aparecen en el corte, como por las dimensiones de éstas. Es decir, se produce un crecimiento cuya única causa lógica es la influencia que tiene el ejercicio sobre este tejido, y se puede demostrar cómo este fenómeno constituye una adaptación progresiva a la mayor demanda de trabajo mecánico ejercida sobre él.

En este sentido todo apunta a la validez de nuestro protocolo y a la concordancia con otros autores, como Goldspink (1964) e Ikai y Fukunaga (1970), que observaron el fenómeno y abrieron un nuevo camino en la investigación sobre este punto. El aumento en el número de fibras de contracción lenta, más resistentes a la fatiga, y de las de contracción rápida, con facilidad para la fatiga, en diferente proporción para cada grupo de deportistas, parece la consecuencia lógica a la adaptación a cada tipo de ejercicio.

Como hemos dicho al comienzo de esta consideración, este dato planteado desde el punto de vista morfológico ya llama la atención sobre el fenómeno de crecimiento muscular, pero su análisis en profundidad lo haremos al valorar las modificaciones que aparecen en el estudio ultraestructural de las miofibrillas en los distintos grupos de atletas.

14.2.- VARIACIONES MORFOLÓGICAS EN LA DOTACIÓN MITOCONDRIAL.

Otro dato morfológico a favor de la correcta diversificación de los tipos de fibras en nuestros grupos de trabajo, puede derivarse de la distribución de organelas citoplásmicas, y así vemos cómo las fibras predominantes en los atletas de resistencia, presentan grupos de mitocondrias subsarcolémicas y perinucleares, con mayor frecuencia que el resto de las fibras, y las de localización intermiofibrilar son también más abundantes y de mayor tamaño, orientándonos a incluirlas entre las fibras tipo I. Mientras, en las imágenes obtenidas de los atletas de velocidad, las fibras más abundantes no tienen acúmulos subsarcolémicos y no son tan llamativos los que se localizan alrededor del núcleo. También las mitocondrias que se disponen entre las

miofibrillas son menos numerosas y de menor tamaño. Es decir, concuerdan con los datos morfológicos propuestos para las fibras tipo II por Ogata y Yamasaki (1985).

Los resultados morfológicos que hemos obtenido, concuerdan con los de Shafiq y cols (1966), que demuestran el mayor tamaño de las mitocondrias en las fibras tipo I, aunque ellos hacen un estudio destinado solo a profundizar en la morfología de la organela y apuntan también que existe una mayor complejidad en las crestas de estas mitocondrias. Por todos los datos estudiados sobre el metabolismo de este tipo de fibra de contracción lenta y muy resistente a la fatiga, y por su forma de conseguir energía para la contracción muscular, parece correcta la necesidad de un soporte metabólico amplio, capaz de mantener en funcionamiento las cadenas respiratorias durante largos periodos de tiempo. Estos hechos hacen pensar que el ejercicio de resistencia estimula el desarrollo de este tipo de fibra de tipo I y todas sus organelas implicadas en el aporte energético.

La morfología específica descrita por Gauthier (1970) para las mitocondrias de las diferentes localizaciones en este tipo de fibra, también la hemos encontrado en las muestras, incluso las grandes mitocondrias que aparecen entre las miofibrillas, con sus prolongaciones laterales a ambos lados de la línea Z y que son de mayor tamaño en los grupos de deportistas, sobre todo de resistencia, que en los controles. La localización de las mitocondrias intermiofibrilares, a ambos lados de la línea Z, es un clásico en todas las descripciones, como Ogata y Yamasaki (1985) demostraron con imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido, que no dejaban lugar a dudas.

Pero el hablar de "mitocondrias limitantes bandas I" como término definitorio de un tipo de mitocondrias, propuesto por Padykula y Gauthier (1967) y Schmalbruch (1970) es más impreciso. Por un lado, en esta localización, en el límite entre las bandas A e I, pueden encontrarse tanto pequeñas mitocondrias, como los brazos y prolongaciones que emiten las subsarcolémicas entre las miofibrillas adyacentes, o bien los brazos de las grandes mitocondrias, en un corte que no incluya el cuerpo de esta organela. También influye la forma en que se ha fijado el tejido. Si no se fija en extensión, para que la sarcómera mantenga su tamaño de relajación, hay una tendencia durante los primeros momentos de falta de aporte de Ca^{2+} , a desarrollar un fenómeno de tetanización de la muestra de músculo, por falta de reposición de ATP para invertir la contracción. Es un fenómeno similar al que se produce en el "rigor mortis", con lo que la unión de las bandas A-I quedarían más cerca de la línea Z y las mitocondrias de una y otra localización se confundirían.

Los autores consultados no hacen mención de este dato, salvo Ogata y su equipo, que fijan en extensión y aceptan como válidas las tres posibilidades en el origen de las mitocondrias en la banda I. El por qué de esta localización predominante a ambos lados de la línea Z, puede tener su explicación en el planteamiento del procedimiento mecánico de la contracción. Por el deslizamiento de los filamentos, la región a ambos lados de la banda H va a sufrir modificaciones importantes y continuas por el deslizamiento de filamentos, luego es preferible que sobre ella no se localizan elementos rígidos de citoplasma, que limiten el desplazamiento. Por otro lado, el sistema de triadas implicadas en el transporte de Ca^{2+} utilizable en la contracción, integrado por las cisternas terminales de RS y los túbulos T, se sitúa también a ambos lados de la línea Z, en la unión A-I, y en este transporte es necesario el consumo de grandes cantidades de energía, que pueden ser suministradas directamente por las mitocondrias contiguas.

Ogata y Yamasaki (1987) también estudiaron la morfología de la dotación mitocondrial en el músculo de anfibios, constatando una mayor simplicidad que en sus primeros estudios en músculo de rata. En nuestro trabajo encontramos una gran similitud entre la distribución de mitocondrias en fibras humanas, y la morfología descrita por estos autores en otros mamíferos. Shafiq y cols. (1966) y Ogata y Murata (1969) en fibras de músculo humano, ya habían adelantado la descripción de estas formas y localizaciones utilizando el microscopio electrónico de transmisión. Por los resultados de ambos trabajos, parece que en el músculo humano se mantiene la forma y distribución, pero son mucho menos numerosas que en el equivalente de rata.

En nuestro caso sí podemos constatar una mayor complejidad en el condrioma de los tipos de fibras que aparecen en los grupos de deportistas en comparación con los controles, por lo que deducimos que la simplicidad que estos autores han encontrado en sus muestras es debida a que su estudio se realizó en personas de vida sedentaria, con músculos que necesitan menos consumo de energía por su menor utilización.

Para ellos, la acumulación mitocondrial se observa rara vez en los cortes de fibras rojas, pero las hay distribuidas individualmente bajo el sarcolema y difieren en número y dimensiones en los tres tipos de fibra, disminuyendo en tamaño y en número desde las rojas a las intermedias y blancas. Stein y Padykula (1962) las describen como un brazalete en forma de malla, alrededor de las miofibrillas a nivel de la banda I, además de grandes y redondas en la banda A, que no existen en las blancas.

Las grandes mitocondrias interfibrilares con sus brazos rodeando la miofibrilla, pueden verse a veces ocupando bandas A, pero no en toda la circunferencia de la miofibrilla, lo que permite la contracción. No sabemos si la falta de esta forma de

mitocondrias en las fibras tipo IIa y IIb puede deberse precisamente a que la contracción rápida de estas células estaría limitada por la barrera mecánica mitocondrial, pero las de contracción lenta tipo I, que a la vez son muy resistente, necesitan mayor aporte de ATP producido en estas mitocondrias, y por eso las mantiene aun a riesgo de un posible impedimento mecánico.

14.3.- VARIACIONES MORFOLÓGICAS EN EL RETÍCULO SARCOPLÁSMICO Y TÚBULOS T.

Otro dato ultraestructural a considerar en la veracidad de la clasificación de los tipos de fibras, es la variación que observamos en la distribución del RS y túbulos T en nuestras preparaciones. En las fibras que clasificamos como tipo I de nuestros grupos, son poco manifiestos y de menor calibre que en las tipo II. En el corte longitudinal se localizan sacos de RS en las proximidades de la unión A-I en ambos casos, más o menos comprimidos o desplazados hacia la línea Z, en función del número de mitocondrias a ese nivel. En el corte transversal se aprecian mejor por su estructura membranosa algo más circunferencial, que se localiza con mayor frecuencia en los vértices de los polígonos de miofibrillas. Cuando estos paquetes densos son de gran tamaño, también pueden localizarse en las caras laterales.

El sistema de túbulos T es difícil de ver por sus reducidas dimensiones transversales, pero su localización en zonas concretas A-I y en relación con el RS, ayuda a localizarlos. A veces solo aparecen como una estructura membranosa en forma de saco aplanado, y en otras algo más dilatado, entre dos cisternas de RS, de forma que la típica estructura descrita por Andersen-Cedergreen (1959) y las triadas de Franzini-Armstrong (1971), son difíciles de apreciar.

En la proporción y distribución de este sistema de membranas, tenemos que hacer dos puntualizaciones. Por un lado, la relación inversa entre el tamaño de las mitocondrias y el de las triadas y por otro, la mayor o menor cantidad de cisternas de RS que rodea las miofibrillas de cada tipo de fibra.

En el primer caso puede deberse a fenómenos de compresión, que no parece lógico porque dificultaría el transporte de Ca^{2+} y disminuiría el rendimiento de la fibra. También puede pensarse en una menor necesidad de superficie de intercambio de iones. De hecho, la mecánica de las fibras tipo I estaría de acuerdo con esta última justificación: al contraerse con más lentitud, hay más tiempo para que la redistribución de iones tenga lugar, sin necesidad de una gran superficie de membranas. Sin embargo, en las fibras tipo II, de contracción rápida, el intercambio es el mismo, pero al disminuir

el tiempo para llevarlo a cabo, necesitan una mayor superficie con receptores y bombas de intercambio de iones.

El segundo punto en cuanto a la preferente localización en los vértices, creemos que se trata simplemente de un problema de espacio, más amplio en estos puntos, de forma que solo cuando se requiere una mayor cantidad de membranas, para rodear a una miofibrilla con más número de elementos integradores, ocupa los lados entre dos de ellas, bastante más estrechos que los vértices.

La localización de las triadas a nivel de la unión de las bandas A-I en todos los tipos de fibras del músculo esquelético, puede tener un significado funcional en cuanto al punto en que se inicia la fijación de Ca^{2+} en la molécula de TnC en el filamento de actina. Es decir, además de la distribución en red más o menos compleja que Ogata y Yamasaki (1985) describieron en sus trabajos con MEB, Fryer y Neering (1986) demostraron que el calcio se libera antes en las zonas contiguas al túbulo T que en el centro de los sacos de RS, y por tanto, es más fácil que pase en primer lugar al hialoplasma y a la TnC en esta localización y la fijación de Ca^{2+} sea diferente en el tiempo.

El mismo razonamiento puede seguirse con el grosor de la red de túbulos T entre dos cisternas al corte longitudinal, más estrechos en las fibras ST que en las FT. Este hecho puede deberse a la menor proporción de proteoglicanos en las fibras de contracción lenta, como han visto Davis y Carlson (1995), o estar en dependencia de esa mayor o menor cantidad de Ca^{2+} que necesita cada tipo de célula muscular para una correcta función, ya que la diferencia de distribución de RS de unos tipos de fibra a otros, es más marcada en los deportistas que en los controles.

Como ya veremos más adelante, el aumento en la extensión de la red del RS y túbulos T en las fibras musculares de los deportistas, está en relación directa con el aumento en el número de miofibrillas tanto longitudinal como transversal. Estos datos ya habían sido expuestos en las trabajos de Shear y Goldspink (1971). Shafiq y cols. (1981) llaman la atención sobre la necesidad del crecimiento simultáneo de las dos estructuras, basándose en la necesidad de que la velocidad de ceder y secuestrar Ca^{2+} , debe mantenerse constante en cada miofibrilla, para que la contracción sea eficaz y no se produzcan lesiones por falta de coordinación.

Sato y cols. (1986) hablaron de la densidad de los túbulos T, que aparecen en menor cantidad en las fibras tipo I que en las II, pero nosotros no hemos visto esta diferencia en los deportistas de resistencia ni en los de velocidad, y sin embargo si

hemos podido apreciar la formación de este sistema de invaginaciones a partir de la membrana, aunque es verdad que se visualizan peor en las tipo I, pero nuestras limitaciones para identificar esta estructura, cuando su mecanismo bioquímico de acción está tan demostrado (Klitgaard y cols., 1989; Dulhunty y cols. 1987; Viru, 1994; Maguire y cols. 1997), no pueden hacer dudar de su presencia constante en esta localización.

En cuanto a sus variaciones con el ejercicio, nuestros resultados son similares a los aportados por Alway y cols. (1989) en atletas de velocidad, en los que aumentan directamente en las fibras tipo I y en la mayor proporción en las tipo II, siempre en proporción con el aumento de tamaño de cada fibra, y los de Sukhova y cols. (1991) que utilizan biopsias musculares con la misma localización que nosotros y también comprueban que la densidad del sistema de membranas aumenta en un 28,5% en atletas de resistencia y un 36% en los de velocidad. En nuestros grupos no hemos llegado a cuantificar las dimensiones de la red, pero por las imágenes obtenidas en microscopía electrónica, estamos en condiciones de afirmar que las fibras caracterizadas como de tipo I, presentan sacos de RS de menor calibre y aumentan proporcionalmente menos que en los atletas de velocidad.

14.4.- VARIACIONES EN EL SUSTRATO ENERGÉTICO.

La reserva energética que presenta datos morfológicos a nivel de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica, está representado por el glucógeno y las gotas lipídicas. Con respecto al primero, vemos que en nuestros resultados se observa de forma más abundante y constante en los deportistas que en los estudiantes, y más aun en los deportistas de velocidad que llevan siete años de entrenamiento. Sin embargo, este dato no es útil para valorar el tipo de fibra que tenemos delante, porque aunque sabemos de otros autores que han determinado que el depósito es mayor en los deportistas de velocidad (Saltin y cols. 1976; Abernethy y cols., 1990), depende muy directamente de la alimentación y el ejercicio inmediatamente anterior a la toma de la muestra (Viru 1994) y nosotros no hemos tenido en cuenta este dato, por no ser necesario para nuestros objetivos.

Sin embargo, las gotas lipídicas intermiofibrilares que solo aparecen en las fibras tipo I y no en las tipo II, descritas por Lehninger (1967) y confirmadas por Abernethy y cols. (1990), sí se localizan en esta posición en el tipo de fibra predominante en los deportistas de resistencia y no en los de velocidad.

Con todas estas coincidencias creemos estar en condiciones de afirmar que los datos morfológicos y ultraestructurales que imputamos a cada tipo de fibra, están en

consonancia con las teorías y datos aportados por el resto de los autores consultados, hecho que además se reafirma como veremos, al poder apoyar plenamente en ellos los datos funcionales obtenidos por técnicas histoquímicas. Por lo tanto, las variaciones que produzcan en las fibras de cada grupo el diferente ejercicio pueden ser perfectamente valoradas.

15.- VARIACIONES MORFOLÓGICAS INDUCIDAS POR EL EJERCICIO EN CADA GRUPO DE NUESTRO PROTOCOLO.

Una vez comprobada la normalidad morfológica del tejido muscular que estudiamos en las muestras de cada donante, estamos en condiciones de discutir los datos expuestos en los resultados en cuanto al efecto que produce en la estructura de los tipos de fibra, la modalidad de ejercicio elegido por cada grupo.

Antes de profundizar en este apartado, tenemos que insistir en el hecho de que la descripción que hemos llevado a cabo en los resultados, sobre las diferencias morfológicas de las fibras que integran cada grupo, están basadas en la de sus formas predominantes. Es decir, en los atletas de resistencia el cambio afecta sobre todo a la población de células tipo I, mientras que los de velocidad muestran mayores diferencias en las fibras tipo IIa y IIb. De esta forma, en los deportistas de resistencia insistimos en las características y modificaciones de las tipo I, como hechos más llamativos, pero no quiere decir que los otros tipos no varíen. Las tipo IIc y sobre todo las IIa y IIb muestran variaciones similares a las que aparecen en los deportistas de velocidad, pero en menor número, porque son un tipo menos numeroso en los ciclistas. Estos hechos, pero a la inversa, se detectan en los atletas de velocidad, por lo que en ellos hacemos más hincapié en las modificaciones de las fibras tipo II, aunque también crecen las tipo I. El mismo planteamiento vamos a seguir en esta discusión, para no hacer el proceso demasiado repetitivo.

15.1.- VARIACIONES EN EL CRECIMIENTO LONGITUDINAL.

Como ya hemos visto, las descripciones de las células se han hecho siguiendo primero las modificaciones que se presentan en los extremos, para luego describir lo que sucede en la porción central de la célula. Creemos que esta forma de plantear los resultados, puede facilitar en gran medida la comprensión de los fenómenos de crecimiento que el ejercicio impone en las fibras musculares. Así vemos cómo tanto los atletas de resistencia como los de velocidad, siguen trayectorias paralelas en cuanto a

conseguir mayor masa muscular, pero con modificaciones que difieren en algunos puntos.

En términos generales, sin llegar al extremo de Williams y Goldspink (1971), que contaron el número de sarcómeras en músculos de animales de diferentes edades, para ver el crecimiento de estas fibras, ni el marcaje con isótopos radiactivos en el extremo final de las miofibrillas, que desarrollaron paralelamente Goldspink, Larson y Davies (1970), es fácil deducir que todas las transformaciones que se visualizan en los extremos de las fibras musculares de los deportistas, están en relación con un fenómeno de crecimiento longitudinal de este tejido.

Las imágenes indicadoras de crecimiento de la fibra muscular en cada grupo, nos habla de la posibilidad de responder de forma diferente a los distintos trabajos impuestos. Ya desde los cortes semifinos, podemos ver que los extremos de las fibras predominantes en los atletas de resistencia, son más largos, más afilados y terminan de forma puntiaguda, presentando con mucha frecuencia un núcleo en el extremo final, a modo de remate. Mientras tanto, en los atletas de velocidad, el extremo final con mayor frecuencia es más ancho y romo, mostrando a veces una protuberancia redondeada en este extremo, que normalmente no tiene núcleo final, sino lateral, en las proximidades del arranque de la protuberancia.

Las zonas laterales de estos extremos en ambos tipos de fibras, son diferentes, con mayor número de núcleos que en los sujetos control en ambos casos, y muchos más en las fibras de los atletas de velocidad que en el mismo tipo de los atletas de resistencia. En este caso, aparecen individualizados o alineados en grupos de tres, cinco o más. En general, los núcleos de estos miocitos son de formas globulosas con nucleolos marcados. La presencia de células con cromatina más densa en estas localizaciones es mayor que en los sujetos control, y parecen corresponder a células satélites.

El por qué de esta distinta morfología, podemos deducirla del trabajo mecánico que impone a las fibras, cada uno de los deportes: en el entrenamiento para resistencia, se producen contracciones a velocidad constante, mantenidas mucho tiempo, por lo que necesita fibras tipo I, más delgadas, con puntos de inserción de las sarcómeras y de las células que soporten muchas contracciones, aunque no tienen que desarrollar su máxima potencia. Según los trabajos de Roy y cols (1982), las fibras ST ganan en elasticidad y resistencia si el tamaño de sus miofibrillas se mantiene en forma de paquete delgado, con gran cantidad de proveedores de energía entre ellos, para mantener el trabajo durante largo tiempo. Sin embargo, las fibras de contracción rápida,

tipo II, que son las implicadas en los deportes de velocidad, tienen que estar preparadas para desarrollar la máxima potencia en el menor tiempo, por tanto, sus puntos de inserción deben ser anchos, igual que los paquetes de miofibrillas, como se deduce de los trabajos de Bershitsky y cols. (1997), de forma que si una fuerza excesiva es capaz de romper la inserción, no lo haga en su totalidad, evitando lesiones intra y extracelulares.

Estos datos se pueden aplicar a nuestros modelos y vemos que es un patrón morfológico que se mantiene en todos los grupos de deportistas. Sin embargo, en los controles no es tan marcada la diferencia en los extremos de ambos tipos de fibras. En primer lugar no se observan constantes señales de crecimiento y en segundo lugar, la vida diaria de tipo sedentario, no lleva a desarrollar predominantemente ninguno de los tipos de fibras, por lo que las inserciones no tienen una definición específica.

Visto ya con microscopía electrónica, las imágenes llamativas de crecimiento longitudinal en los atletas de resistencia con tres años de práctica deportiva, son evidentes, mostrando señales que indican una actividad de síntesis proteica constante. Desde la estructura de los núcleos cercanos, con sus nucleolos marcados y sus poros nucleares extraordinariamente activos, hasta los datos citoplásmicos, como el aumento en el número y dilatación de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso perinucleares, tan poco manifiestas normalmente, el aumento en el número de polirribosomas en sus proximidades, los pequeños acúmulos de material fibrilar y granular denso, en las cercanías de la membrana plasmática y en los extremos de las miofibrillas y el hecho de casi no aparecer líneas Z en los extremos finales, suponemos que para permitir la polimerización de nuevos miofilamentos.

Una demostración bioquímica que confirme estos hechos, podemos encontrarla en los recientes trabajos de Rosser y cols. (1995) que nos hablan de un aumento de concentración de moléculas de MHCneo en los extremos de las fibras en crecimiento. Estos autores piensan que los núcleos en esta zona, transcriben para RNAm capaz de inducir la síntesis de estas cadenas, similares a las que se encuentran en la vida fetal, y por eso las miosinas recién formadas en el extremo distal son de este tipo.

Aparte de estas moléculas de RNAm detectadas en condiciones normales, Neuffer y cols. (1996) también apuntan la existencia de RNAr y RNAm en esta localización, cuando un músculo se estimula eléctricamente. La presencia de estos dos tipos de moléculas se asocian constantemente a la fabricación de proteínas, y en el caso concreto de la fibra muscular, Young y cols. (1975) demostraron que este proceso tiene lugar en las proximidades de las membranas de la célula.

El frente de avance afilado, parece indicarnos que son las miofibrillas centrales las que primero aumentan su número de sarcómeras, para después ir adicionando nuevos elementos en las miofibrillas laterales que rodean a éstas y así sucesivamente hasta llegar a las más externas. El extremo actúa a modo de cuña, abriéndose paso entre las demás fibras musculares que le rodean, profundizando en el conjuntivo subyacente. Sin embargo, el crecimiento del extremo final de las fibras tipo II de los atletas de velocidad, al ser más ancho, hace que sean varias las miofibrillas que van adicionando nuevas sarcómeras, de forma menos ordenada que en las fibras descritas en los atletas de resistencia.

Esta descripción parece contraria a lo que acabamos de describir en el párrafo anterior pero debemos pensar que la miofibrilla central de las tipo I, se encuentra a la misma distancia de la membrana que las laterales, gracias su forma cónica. En el caso del crecimiento de las miofibrillas en las fibras tipo II, puede producirse en las fibras centrales, más alejadas de la membrana, una forma de crecimiento similar a la que se produce en la zona media de la célula, para aumentar su diámetro transversal, y ya veremos entonces que no hay ninguna contradicción.

También hemos llamado la atención sobre la diferente densidad de la membrana de cada célula en los extremos, sobre todo en relación a paquetes de miofibrillas terminales. Estos hechos pueden explicarse desde dos puntos de vista: por un lado como refuerzo de una zona de inserción de las miofibrillas en el citoplasma, que con el deporte se contraen con más intensidad y durante más tiempo. Por otro, como una zona que recibe señales del conjuntivo adyacente y responde, preparando en la cara interna, las baterías de enzimas necesarias para la nucleación y polimerización de los filamentos de actina y miosina para nuevas sarcómeras. Son puntos sobre los que no hemos encontrado referencias. Realmente es ahora cuando se están caracterizando estas moléculas, que actúan como inductoras o inhibidoras de la polimerización de proteínas filamentosas estructurales del citoesqueleto y creemos que es un punto importante para plantear líneas de investigación, que soporten los datos moleculares que se van dilucidando.

Sabemos por los trabajos de Schafer y cols. (1995) que los filamentos de actina se forman por nucleación y polimerización de sus subunidades en las proximidades de la membrana celular, y en su extremo "más" pueden fijarse proteínas cap-Z, bloqueando su crecimiento y preparándola para que se una a la α -actinina de la línea Z. En el otro extremo, las moléculas de tropomodulina caracterizadas por Fowler y cols. (1993) limitarían el crecimiento del extremo "menos", consiguiendo una longitud útil para integrar la sarcómera. Estos hechos no se pueden ver con las técnicas que hemos

utilizado, pero su existencia durante este proceso es innegable por las consecuencias estructurales conseguidas.

Aparte de la síntesis de estos filamentos, tienen que formarse también moléculas de miosina y las proteínas integradoras de la línea Z. Las primeras se producen en zonas próximas a las membranas y de hecho, los paquetes aislados de miofilamentos gruesos que detectamos en esta localización, ya sea en haces paralelos o perpendiculares al eje de la célula, puede ser la expresión de este proceso. Su síntesis tiene lugar a partir de polirribosomas y RNAm específico en el citoplasma de esta localización (Young y cols., 1975).

Pomeroy y cols. (1991) demostraron que las moléculas de miosina II recién formadas, se van asociando a otros filamentos del citoesqueleto, que van a determinar su ordenación en filamentos paralelos al eje mayor de la célula. Según Kang y cols. (1995) después de esta primera orientación, la acción de la transglutaminasa influye de manera decisiva sobre ellas, para conseguir la forma estable del microfilamento grueso, que ya podríamos comparar con nuestras aportaciones. También Briggs y cols. (1995) demuestran que la unión de estos filamentos tiene lugar en la zona media, en la porción que luego formará la línea M.

Por otro lado, hemos hablado de mayor acumulación de zonas electrodensas en la cara interna de la membrana celular en estas zonas de finalización de las miofibrillas, y por los trabajos de McDonald y cols. (1995) sabemos que es precisamente a ese nivel, donde se produce el nacimiento de las miofibrillas, por ordenación de sus elementos, de forma que las moléculas de integrina actúan como receptores de adhesión, para luego disociarse de su localización y pasar a formar parte de los costámeros, que se tienen que originar en esta zona.

Cómo se asocian estas proteínas en la línea Z, cómo se fabrican y unen entre sí las proteínas que integran la línea Z, es algo que todavía no se conoce. Ya dijimos en su momento (Vigoreaux, 1994) que de la mayoría de las proteínas que se detectan en esta estructura, solo algunas como la α -actinina (Blanchard y cols., 1989) y la Cap-Z (Schafer y cols., 1994) forman componentes estructurales constantes a nivel molecular, mientras que el resto, pueden ser hasta productos de la degradación del trabajo efectuado. El hecho de que la estructura de algunas de estas proteínas sea similar a las que se localizan a nivel de la membrana (espectrina, distrofina, etc.), nos hace pensar que su lugar de integración, podría estar en relación con la membrana plasmática y que las figuras de grumos densos en su cara interna, también podrían corresponder al inicio de formación de líneas Z.

Si nos fijamos, en algunos haces de miofibrillas aislados y pequeños a este nivel, podemos ver uno de sus extremos con una estructura que presenta la misma densidad que la línea Z y la misma que esos gránulos de la membrana. Aun así, no estaremos seguros de estos hechos, hasta que se lleve a cabo su comprobación molecular. Además, para que esta zona de la sarcómera se estabilice y pueda continuar la adición de un nuevo segmento, es necesario que el citoesqueleto adyacente también haya aumentado su concentración en desmina y vimentina, que como Tokuyasu y cols. (1983) demostraron, forman parte de la unión entre varias líneas Z contiguas.

En nuestras preparaciones hemos visto que cuando las miofibrillas terminan directamente en el citoplasma, no hay acúmulos de mitocondrias a este nivel, pero sí aparecen de forma constante en posición intermiofibrilar, en hileras y según nos vamos alejando del extremo hacia porciones más anchas, las hileras disminuyen y aparecen más como elementos aislados a ambos lados de la línea Z. Estas imágenes pueden estar en relación, con la mayor necesidad de aporte energético para el crecimiento, por adición de miofilamentos a las miofibrillas en formación, e incluso para aportarla en la formación de nuevas redes de RS y túbulos T, que se extienden alrededor de las nuevas sarcómeras.

El aumento de metabolismo que imponemos al músculo durante el ejercicio presenta como consecuencia inmediata un aumento en esta organela citoplásmica, directamente implicada en la obtención de energía. No solo sufren variaciones morfológicas, si no también bioquímicas y de la conjunción de ambas surge el acondicionamiento para cada tipo de ejercicio. En general, los datos de los que disponemos en la bibliografía consultada, hacen referencia a variaciones cuantitativas de las mitocondrias, detectando un aumento de su volumen de 4 veces para las fibras FT y 2,5 para las ST (Bylund-Fellenius, 1977) o al revés, más alta para las tipo I que en las II (Wang y cols., 1993), pero estos datos y sus contradicciones también serán analizados con más detenimiento en nuestro apartado de resultados cuantitativos.

Desde el punto de vista morfológico, que ahora nos ocupa, Hoppeler y cols. (1985) hablan de un mayor aumento en la zona subsarcolémica que en la intermiofibrilar en distintos músculos de rata, con entrenamiento de resistencia, y Howald y cols. (1985) detectan en humanos a las 6 semanas y a los 6 meses del mismo tipo de ejercicio, un aumento de volumen en el condrioma de todos los tipos de fibras, con distribución preferentemente interfibrilar para los tipo I y subsarcolémicas en los tipo II. En nuestras imágenes estos hechos no concuerdan completamente. Hay una clara evidencia de aumento de todas ellas, pero la distribución se mantiene proporcionalmente igual que en el patrón normal descrito por Ogata y Yamasaki (1985), excepto en las zonas de

crecimiento, en las que ocupa las posiciones que estábamos analizando. Ninguno de los autores consultados hace referencia a esta diferente distribución de unas zonas a otras, excepto Neuffer y cols. (1996) que estudian el momento en que se desencadena la síntesis proteica, inducida por la estimulación muscular con contracción continuada y detecta RNAm originando en DNA mitocondrial para proteínas HSP60 precisamente más concentradas en los extremos de las fibras. De todas formas, en nuestros casos, y después de tantos años de práctica deportiva, los cambios mitocondriales que se siguen produciendo, deben estar ya perfectamente adaptados a los programas de entrenamiento, para mantener el doble aporte energético, en el trabajo mecánico muscular y en el de síntesis de nuevos elementos proteicos.

Tampoco puede plantearse la valoración paralela de las lesiones que describen Studitsky y cols (1985), como procesos de lesiones en las fibras, al comienzo de programas de entrenamiento, como la presencia de una matriz mitocondrial hinchada, destrucción de crestas y degeneración vacuolar de esta organela. No podemos decir que no se produzca, pero nosotros no hemos estudiado este momento inicial y pensamos que a los tres y siete años de práctica deportiva, cualquier lesión de este tipo puede ser indicativa de una alteración en el ritmo de entrenamiento, bien por inmovilización previa o por mayor demanda de trabajo, hasta llegar a la fatiga.

La localización en hileras subsarcolémicas que se detecta en los extremos de crecimiento longitudinal en todos los grupos de deportistas, está en relación con las zonas laterales de las sarcómeras y en rara ocasión, con los extremos libres de las miofibrillas, por lo que deducimos que necesitan permanecer despejados, para que la asociación y estabilización de filamentos tenga lugar.

Este hecho puede estar apoyado por la imagen de acúmulos perinucleares, que son mayores en las proximidades de los núcleos que mantienen una actividad alta, con nucleolos y poros nucleares visibles. De todas formas, en la mayoría de las fibras de los atletas de resistencia, quedan más hileras de mitocondrias que en los de velocidad, según vamos avanzando hacia zonas más anchas de la célula, como corresponde a la descripción clásica de Ogata y Yamasaki (1985) para este tipo de fibras.

Que en el extremo final encontremos o no, un núcleo, puede ser anecdótico o tener alguna relevancia. Es decir, puede ser casualidad que en el fenómeno de crecimiento, la emigración de estos núcleos para promover y controlar una zona de nueva síntesis de miofibrillas, les lleve a colocarse en esta posición, y según avanza el citoesqueleto los va desplazando lateralmente o, por otro lado, puede convertirse él mismo en un obstáculo temporal que limita el libre crecimiento de la célula.

Las imágenes abigarradas que aparecen en estas mismas zonas en los atletas de resistencia con siete años de entrenamiento, nos hace pensar más bien en esta segunda posibilidad, con desviación de la dirección de crecimiento de las miofibrillas, que se interrumpen a nivel de los núcleos, distorsionando las células, para continuar su formación una vez superado el obstáculo, que queda incluido en un primer momento en la porción central de la célula, suponemos que para ir desplazándose lateralmente, cuando esta zona de la célula crezca en anchura. En este grupo de atletas, el extremo final de las células muestra menos acúmulo de mitocondrias entre las miofibrillas, pero es mayor el perinuclear. Es decir, parece como si el avance de incorporación de nuevas sarcómeras estuviera enlentecido, aunque los núcleos continúan siendo muy activos. También la cantidad de fibrillas libres a este nivel, es menor que en los ciclistas con menos años de dedicación al ejercicio.

De estos datos podemos deducir en primer lugar, que al llegar a los siete años de entrenamiento continuado para resistencia, hay un enlentecimiento de la velocidad de crecimiento de sus fibras musculares, sin que en ninguno de los atletas estudiado se haya constatado una disminución de rendimiento. Por tanto, la otra interpretación posible es que se está llegando a conseguir la forma física ideal, con pleno rendimiento para este tipo de deporte, aunque todavía hay muestras de actividad de síntesis, que puede ser tanto para mantener un crecimiento necesario todavía, o para regeneración de elementos dañados.

Por el número de mionúcleos y sus características morfológicas, los atletas de velocidad con siete años de entrenamiento, continúan aumentando el crecimiento en la zona final en mayor medida que los de resistencia, en apariencia en forma longitudinal, por lo menos en lo que afecta a sus fibras tipo II, con un frente de avance más redondeado. La disposición ordenada de sus núcleos en las caras laterales, puede hablarnos también de una forma de ensanchar el miocito desde los extremos, ya que son estas células las que mayores dimensiones transversales alcanzan en todos los grupos de velocidad. Además sabemos que las fibras tipo IIa, expresan durante más tiempo MHCneo y MHCemb (Schiaffino y Reggiani, 1996), lo que podría estar relacionado con el mayor tiempo de crecimiento activo que encontramos en este tipo de fibras más frecuente en los deportistas de velocidad.

Tampoco podemos estar seguros de que el aumento en el número de núcleos en esta localización sea debida solo a la emigración distal de mionúcleos ya existentes o a la incorporación de nuevos núcleos a partir de células satélites. La localización de estas células en las proximidades de los núcleos del extremo distal, puede estar también en relación con el crecimiento muscular. Es un hecho bastante aceptado, que esta

población celular puede incorporarse a la estructura del miocito y cambiar su morfología hasta ser uno más de los núcleos que lo integran, dirigiendo ellos mismos la síntesis de nuevas moléculas proteicas para miofibrillas y contribuir de esta forma fundamental al crecimiento de las fibras musculares. Para nosotros es un hecho discutible ya que a pesar del gran número de cortes estudiados, en ninguno hemos encontrado una mitosis de estas células, ni imágenes claramente progresivas de incorporación al miocito, con fusión de los citoplasmas y desaparición de sus membranas.

Las variaciones en el número, disposición y estructura de los núcleos en esta localización, pueden tener una relación directa con el tipo de isoformas proteicas para miofilamentos que se estén fabricando en ese momento. En este punto debemos tener en cuenta algunas consideraciones especiales. En primer lugar, si los mionúcleos existentes en un punto de la célula pueden desplazarse a una zona contigua para que esta crezca, controlada por el núcleo. Este hecho supone que el territorio original controlado por este y otros núcleos, no tenía una extensión límite, sino mucho menor. Es decir, si la proporción núcleo/citoplasma se mantiene constante y el número de núcleos no aumenta en el adulto, al crecer el citoplasma, tanto en longitud como en grosor, cada núcleo, que suponemos que no se puede dividir, puede ejercer un control de citoplasma mayor que el que estaba controlando en el sujeto sedentario.

Esto podría indicar que la reserva regenerativa de la célula muscular, no depende de la multiplicación de sus núcleos, sino de que no lleguen a desarrollar todo su potencial evolutivo. De esta manera, la respuesta ante una mayor demanda de trabajo, estaría asegurada. Por otro lado, este sería un dato a favor de la no total diferenciación nuclear, que estaría relacionada con la posibilidad de cambiar la expresión de isoformas génicas y por tanto, de las isoformas proteicas de los filamentos para diferentes tipos de contracción, a lo largo de la vida del individuo.

Lo primero que llama la atención en los núcleos que encontramos en esta zona de crecimiento es su gran actividad: su forma globulosa, que no varía en la contracción, los nucleolos grandes y llamativos, el predominio de eucromatina y los poros nucleares muy activos, nos hablan de fabricación y exportación de RNAm y RNAr en grandes cantidades y ya hemos dicho anteriormente que algunos autores han comprobado, caracterizado y cuantificado este hecho (Neufer y cols., 1996). También hemos llamado la atención sobre la caracterización de las MHC sintetizadas a este nivel que son de la forma MHCneo (Rosser y cols., 1995).

Es decir, un núcleo que en condiciones de reposo estaba ordenando la síntesis de cantidades moderadas de MHCs o MHCf, dependiendo del tipo de fibra muscular al

que pertenecen, por alguna señal inducida por el ejercicio, cambia su morfología y sus programas y empieza a dar nuevas órdenes para fabricar otras moléculas. Estos hechos han sido comprobados en diferentes músculos de rata adulta, en los que fibras que presenta una alta expresión MHC2A, cambian progresivamente durante el desarrollo postnatal y expresan formas lentas de MHC (Butler-Browne y Whalen, 1984). De igual manera hemos mencionado cómo con la edad, en la rata, va disminuyendo la expresión de MHC2B y aumentando la de MHC2X (Sugiura y cols., 1992), por lo que no podemos desechar esta teoría como origen del crecimiento impuesto por el ejercicio.

La otra probabilidad es que estos mionúcleos sean nuevos, incorporados en la célula a partir de las células satélites regionales. Existen datos de incremento de ADN en el músculo esquelético durante el entrenamiento deportivo (Hamosh y cols. 1967; Hubbard y cols. 1985). Estos autores aceptarían por tanto, el planteamiento de Moss y Leblond (1970), Shafiq y cols. (1968) y Schmalbruch (1978) que apoyan la teoría de incorporación de estas células como únicas responsables de la hipertrofia, pero Fleckman y cols. (1978) demostraron que al bloquear la síntesis de DNA, no se frena la hipertrofia de la célula.

Los experimentos de Bischoff (1986) que consiguió la multiplicación y fusión de células satélites en cultivos, activadas por mitógenos, fueron ampliados por McLennan y Koishi (1997) estudiando procesos de reparación de necrosis muscular y viendo cómo el TGF- β 2 fomenta la formación de miotubos "in vivo" a partir de células satélite locales activadas y Phela y Gonyea (1997) demuestran que el TGF-insulina like de los miocitos también activa las células satélites. Pero ninguno de ellos muestra imágenes de mitosis en esta población celular, ni de incorporación al miocito.

Kelly (1978) con H³-timidina, justifica la incorporación de una célula en la otra, por la detección de núcleos marcados, primero en las células satélite y luego en las fibras, pero esto también puede deberse a que ambos núcleos incorporan el producto con un desfase en el tiempo. Tampoco Robertson y cols (1992) en su pretendida demostración de incorporación al miocito, llegan en sus imágenes más allá que nosotros, mostrando algunos puntos de aparente comunicación entre los citoplasmas de ambas células, pero no en una extensión llamativa.

Con las imágenes que nosotros hemos obtenido, sí podemos aceptar que existe una relación muy estrecha entre las células satélites y los núcleos activados de los miocitos, en las zonas de crecimiento de todos los tipos de fibras, por la predominante localización en sus proximidades. La naturaleza de esta influencia no podemos determinarla pero puede estar relacionada a nivel de las aparentes comunicaciones

citoplásmicas, con señales para síntesis proteica o con cambios en la expresión genética de las isoformas proteicas. Por otro lado, las imágenes de refuerzo entre las membranas de ambas células, pueden suponer solo un mejor anclaje para evitar desplazamientos en la contracción muscular impuesta por el entrenamiento.

Una cosa que nos ha llamado la atención, y por eso pensamos que puede enviar señales para crecimiento, es la formación de invaginaciones profundas de la membrana del miocito a este nivel, de muy pequeño calibre y que se dirigen a las miofibrillas. Esta imagen puede ser compatible con la formación de nuevos túbulos T en zonas de crecimiento y solo las vemos cuando coinciden los núcleos de ambas poblaciones celulares. No hemos encontrado referencias sobre este detalle, que nos orienten en su interpretación.

Los nuevos trabajos de Kameda y cols. (1993) y Esser y cols. (1993), estudiando la influencia de la innervación en la maduración de esta población, y la expresión de isoformas de proteínas miofibrilares, tal vez puedan arrojar un poco de luz sobre este punto, que pensamos que sigue todavía lejos de aclararse.

15.2.- VARIACIONES EN EL CRECIMIENTO TRANSVERSAL.

El crecimiento de las fibras de nuestros grupos problema, no solo se produce longitudinalmente en sus extremos finales, sino que en los cortes de la zona media de estas células, se aprecian también cambios morfológicos que nos orientan hacia la necesidad de valorar el crecimiento transversal producido por el incremento en el número de miofibrillas así como el de las cisternas de RS, mitocondrias y el mayor almacenamiento de sustratos energéticos.

Si atendemos a los núcleos, vemos que según nos vamos alejando del extremo, hacia la zona central de la célula, su morfología va variando, con formas más abigarradas y en las que predominan las indentaciones y la cromatina más densa en la cara interna de la carioteca, pero siguen alternando con otros de formas globulosas, similares a los que hemos descrito en los extremos. Esta alternancia en las formas nucleares es mucho más manifiesta en los grupos con tres años de práctica deportiva. A los siete años, en el grupo R25, hay un claro predominio de los núcleos con heterocromatina, sobre los atletas del grupo V25, en los que solo es algo menor que en los corredores más jóvenes.

Si consideramos que la forma nuclear con eucromatina y nucleolos activos, está directamente implicada en la síntesis proteica, la distribución de estos núcleos

demuestra que con el ejercicio continuo, aparecen zonas en el espesor de la célula que necesitan una mayor síntesis de proteínas, que en los sujetos control, y que esta necesidad sigue presente en mayor o menor grado aunque hayan pasado siete años de práctica deportiva. La mayor actividad sintética puede deberse directamente a crecimiento, pero también a cambios reparadores por desgaste o deterioro de las miofibrillas, o a cambios en la expresión isogénica, que a su vez va a inducir modificaciones en la estructura molecular de las miofibrillas, en un proceso de adaptación a la demanda específica del trabajo mecánico impuesto.

A pesar de la descripción de Moore y Ruska (1957) y Franke (1987) como un núcleo con una cantidad de eucromatina de hasta el 76%, Snow (1983) y Scheer y cols. (1993) plantean esta morfología en relación a la actividad muscular en cuanto a síntesis proteica. Es decir, en nuestro caso, se aprecian núcleos con una alta actividad sintética, mientras que otros concentran más su cromatina y exponen menos sus nucleolos, posiblemente por entrar en periodos de descanso. De hecho, hemos visto la coincidencia de zonas citoplásmicas estables, sin señales de rotura y con poca degeneración en las miofibrillas, coincidiendo con estos núcleos heterocromáticos.

Los poros nucleares se aprecian con igual claridad en ambas formas nucleares y no vemos que sean más patentes en zona de regeneración como afirmaron Price y cols. (1964) en sus trabajos. Esta impresión puede deberse a que en los núcleos heterocromáticos el contraste entre la densidad de esta cromatina y la falta de ella a nivel de los poros se hace más patente, pero a mayores aumentos, parece que el paso de productos en estas zonas es más activo en zonas de regeneración. Estas impresiones y la mayor actividad de los polirribosomas y retículo endoplásmico rugoso a este nivel, nos hacen pensar que el paso de proteínas, RNAm y RNAr, son constantes en esos momentos metabólicos, como ya demostraron Pante y Aebi (1993).

Otro punto sobre el que debemos insistir aquí, es el que no hemos detectado en ningún momento, datos que hagan sospechar alguna actividad mitótica en estos núcleos, como ya han demostrado numerosos autores (McCallun, 1898; Rowe y Goldspink, 1969; Stickland y Goldspink, 1973; Nygaard, 1982 y Rosser y cols. 1995), con los que estamos completamente de acuerdo, como tampoco la presentan las células satélite que se localizan en sus proximidades, a pesar de los datos aportados por Tamaki y cols. (1997) recientemente, apoyándose en el aumento de captación de aminoácidos y síntesis proteica en estas células.

Nosotros también hemos visto en esta localización igual que en los extremos, en las proximidades de los núcleos más activos de miocitos, la presencia de células

satélites, de características similares a los que hemos descrito en el apartado anterior. En la zona perinuclear de todas ellas se localizan porciones de citoplasma con mayor concentración de retículo endoplásmico rugoso, polirribosomas y mitocondrias, con expresión de mayor actividad metabólica, pero no se aprecian centriolos ni condensación de cromosomas, ni ninguna muestra de una posible actividad mitótica en estas células.

En las proximidades de estos núcleos, aparecen figuras de rotura de miofibrillas, con características propias según se trate de fibras tipo I o tipo II. Bien es verdad que ambas imágenes podemos encontrarlas en todos los tipos de fibras, pero el predominio de las tipo I en los atletas de resistencia y las tipo II en los de velocidad es tan claro, que solo merece la pena tenerlo en cuenta si pensamos en las formas de transición descritas con MoAb para las isoformas de proteínas de fibras ST y FT, que comentaremos más adelante.

La rotura y división de las miofibrillas, para luego adicionar nuevos miofilamentos en sus porciones periféricas, puede deberse a la necesidad de aumentar el número de sarcómeras, no solo en serie, sino también en paralelo, para asegurarnos una contracción eficaz y con máximo rendimiento. El mecanismo de proliferación de las miofibrillas ha sido bien estudiado por Goldspink (1968) demostrando que cuando las miofibrillas llegan a una talla crítica, se rompen para separarse longitudinalmente. Una de las causas puede achacarse al hecho de que nuevos miofilamentos que se van formando inducidos por el ejercicio, se van sumando a las miofibrillas ya formadas, en sus zonas periféricas y producen un alejamiento progresivo entre los miofilamentos centrales, las cisternas que aportan el Ca^{2+} y las mitocondrias que aportan la energía para la contracción. De esta manera, llega un momento en que esta distancia supone una dificultad en el recambio iónico y energético de cada contracción y se impone la división de la miofibrilla.

La mayoría de los autores plantean este fenómeno como procesos de reparación de miofibrillas interrumpidas al principio de programas de entrenamiento (Gibala y cols. 1995) y consideran que siempre están precedidas de un daño tisular, que depende de la intensidad del ejercicio (Tamaki y cols. 1997). En nuestro caso no estamos hablando, ni mucho menos, de un inicio de ejercicio, por que ya llevamos al menos tres años de entrenamiento, pero también podríamos interpretarlo solo como un defecto mecánico, al imponer una mayor cantidad de contracciones con el entrenamiento, que producirían roturas en las líneas Z que van a sufrir las tracciones continuas más o menos intensas, que deben ser restauradas, siendo en este proceso de reparación de desajuste de

filamentos donde se produce el desdoblamiento de las miofibrillas para prevenir una nueva lesión similar.

La diferente forma de producirse la rotura y el aumento en el número de miofibrillas entre los dos tipos de fibras, ya ha sido apuntada por Shear y Goldspink (1971) que hablaban de roturas con punteado continuo en las fibras FT y bifurcaciones en las ST. Después se ha abandonado esta diferencia, aunque Sjöström (1987) hace una ligera mención a este hecho en sus trabajos. Nosotros hemos podido constatar en nuestros resultados estas diferencias, viendo como en las fibras predominantes en deportistas de resistencia, las tipo I, la rotura de las miofibrillas, cuando son anchas y cuentan con gran número de miofilamentos, se produce en la porción central, con una separación que se inicia a nivel de la línea Z, y se extiende longitudinalmente a ambos lados, hacia la siguiente línea Z.

La distribución de separaciones varía en el espesor de la fibra muscular, siendo más numerosas en zonas periféricas de las células, y coincidiendo, como ya hemos apuntado anteriormente, con zonas de mionúcleos activos.

Cuando la separación va avanzando y se hace más patente en su zona media, se empieza a localizar en esta zona vesículas de RS, polirribosomas, partículas de glucógeno, alguna gota lipídica e incluso mitocondrias pequeñas. Es decir, se está consolidando la separación morfológica y funcionalmente, hecho apuntado por Gollnick (1980).

De todas formas, esta descripción no es del todo exacta. La imagen así obtenida es la que encontramos en el corte longitudinal, pero en el transversal, vemos como una porción de hialoplasma, penetra desde el borde de la miofibrilla, hacia el centro, dividiendo en dos partes la figura poligonal inicial. Ambas imágenes son compatibles y no modifican el criterio de división, pero explican cómo desde el primer momento podemos ver una porción de hialoplasma interpuesto entre las dos porciones de la línea Z dividida.

La velocidad de separación va avanzando en varias sarcómeras, pero en los cortes longitudinales en los que se consigue la continuidad con un extremo distal de la fibra, vemos que el avance es mayor y por tanto la separación se completa antes en dirección distal de la célula y avanza más lentamente en dirección central. Esto puede indicarnos que el citoplasma de la fibra muscular, alcanza antes su contracción eficaz en las zonas centrales de la célula que en las distales y es precisamente esta falta de

equilibrio en esas zonas, uno de los factores que más pueden influir par el crecimiento adaptativo.

El número de estas divisiones disminuye considerablemente entre R21 y R25, pero se mantiene constante la imagen que podríamos atribuir a procesos reparadores del excesivo uso de las sarcómeras y que es igual en todos los tipos de fibras. Esta disminución de bifurcaciones parece indicar que en los atletas de resistencia se completa antes que en los de velocidad el tamaño de fibra óptimo para el máximo rendimiento en esta especialidad.

Un último dato a tener en cuenta a esta forma de bifurcación y que afecta también a la que comentamos a continuación en las fibras FT, es una reflexión sobre la demostración de tipos de miosinas en su forma de expresión más joven que Rosser y cols. (1995) llevaron a cabo en los extremos de crecimiento longitudinal. Según estos autores, la síntesis de MHCneo es propia de zonas en crecimiento, y posteriormente, al avanzar el frente de crecimiento, las zonas que quedan en zonas más anchas, van cambiando a una expresión MHCs o MHCf. No hemos encontrado datos sobre la forma en que se presentan las miosinas nuevas de los miofilamentos que se van sintetizando y adicionando en las zonas longitudinales, pero creemos que la demostración de síntesis de formas MHCneo en esta localización, podría confirmar más la idea de "crecimiento", mientras que si directamente se sintetizan las MHC de forma adulta, el proceso sería de "reparación".

En las fibras tipo II, predominantes en los atletas de velocidad, en lugar de ver estas separaciones, vemos roturas en varios puntos de la línea Z. Su distribución es similar a la que hemos descrito para los deportistas de resistencia, es decir se localizan con más frecuencia en las zonas periféricas de la célula y aun más en las proximidades a un mionúcleo con nucleolo patente y numerosos poros nucleares, y con las modificaciones del citoplasma perinuclear que impone esta estructura nuclear. La diferencia es que es una imagen que puede verse también en zonas muy próximas al extremo ancho de la fibra, en su porción intermedia, pero esto puede deberse al crecimiento de estas fibras FT buscando más puntos de inserción par cada una de ellas.

Shear y Goldspink (1971) habían descrito esta forma de rotura en las fibras FT, confirmando la diferencia en el modo de crecimiento transversal en ambos tipos de fibras. La buena orientación de este criterio empieza a tener su confirmación en los trabajos de Sjöström y cols. (1982a) que estudian las características de las líneas Z y M en cada tipo de fibra, estableciendo las medidas en cada una de ellas, en un primer intento de caracterizar la distribución de los componentes de estas zonas, y obtener un

elemento morfológico más en la clasificación. Estos autores llegaron a la conclusión de que el grosor de la línea Z en las fibras tipo I es mayor que en las tipo IIa y IIb. Posteriormente, la caracterización de la composición bioquímica de las proteínas que componen esta estructura por Blanchard y cols. (1989), y la demostración de isoformas distintas para cada tipo de fibra muscular por Schafer y cols. (1994), sirvieron a Vigoreaux (1994) como base para implicar a esta diferente composición como responsable en parte, de la distinta forma de rotura por stress en cada tipo de fibra.

No hay descripciones del crecimiento de las fibras tipo II, en cortes transversales pero en las muestras que nosotros hemos obtenido, se observa una imagen compatible con la teoría anterior, en la que vemos varias pequeñas invasiones de hialoplasma dirigidas hacia la zona central, pero de forma más asimétrica que en el caso precedente. Esta zona de rotura expone muchos más puntos de nueva inserción, luego permite un crecimiento en grosor más rápido en este tipo de fibras, y de hecho, este dato coincide con los resultados cuantitativos que veremos más adelante. El proceso molecular de síntesis de los nuevos miofilamentos no se aprecia con las técnicas que hemos utilizado pero con los datos estudiados en la bibliografía podemos llegar a conclusiones compatibles con nuestras imágenes.

Además de estas roturas longitudinales, hay otras transversales coincidentes con fracturas de los miofilamentos en zona I o A-I, pero no normalmente en zona A. Esto podría indicarnos que es mucho más estable mecánicamente la unión entre los filamentos de miosina que entre los de actina, aunque también podemos pensar que no es una rotura lo que vemos, sino la formación longitudinal de nuevas fibrillas, a partir de las líneas Z rotas, con velocidad de adición de miofilamentos diferente entre ambos extremos.

De todas formas, se han visto diferencias en la línea M, que nos hablan de menos puentes de unión transversal entre los filamentos de miosina en su porción central (Sjöström y cols. 1982a), en las fibras tipo II que en las tipo I, de forma que nos induciría a pensar en una mayor facilidad de rotura a este nivel, y sin embargo, no hemos visto ninguna en los múltiples cortes estudiados. Tampoco se han caracterizado todavía isoformas en las moléculas de miomesina y proteína M y se tienen pocos datos de su organización espacial en la línea M, capaz de proporcionar este alto grado de resistencia.

En el apartado correspondiente al crecimiento longitudinal hemos comentado cómo la síntesis de nuevos filamentos produce en relación con proteínas y grupos enzimáticos próximos a la membrana celular, y es de suponer que el sistema sea similar

en zonas más profundas de la fibra. De hecho, en esas porciones de hialoplasma que penetran en las zonas de rotura de las miofibrillas, aparecen polirribosomas que nos indican ya un proceso de síntesis proteica. El otro componente, la membrana celular, también tiene su representación a este nivel en forma de túbulos T, y ya hemos dicho que cuando las roturas se consolidan, empiezan a localizarse entre ellas cisternas del sistema de membranas y mitocondrias, que van a aportar el resto de elementos necesarios para que la síntesis de todos los tipos de miofilamentos pueda llevarse a cabo, con adición a los que ya existían como modelo previo. Posiblemente la demostración por parte de Muñoz y cols. (1995) y Wakayama y cols. (1997) de la existencia de subcompartimentos en el sarcolema, con caveolas provistas de diferentes tipos de receptores para β -integrina, caveolina, clatrina, distrofina y α -1 sintrofina, sean la base para llegar a entender este mecanismo de síntesis y organización de miofilamentos, que implica a la membrana celular y sus proteínas constituyentes.

A diferencia de los grupos de resistencia, en estos atletas de velocidad, el número de roturas a los siete años de inicio del entrenamiento, se mantiene alto, orientándonos sobre la posibilidad de conseguir una masa muscular total de más envergadura, para llegar en un mayor tiempo al rendimiento óptimo.

Otras imágenes que aparecen con frecuencia similar en todos los grupos de deportistas y en muchos de los cortes del grupo control, son las zonas de enrarecimiento del paquete de miofilamentos en el punto de contacto con la línea Z, y que nosotros hemos interpretado como zonas dañadas de la sarcómera, con necesidad de reparación. El llegar a esta conclusión es el resultado de plantearse el trabajo que sufre cada filamento en la contracción: las moléculas de nebulina, actina, tropomiosina y troponina, solo sufren pequeños desplazamientos laterales entre ellos para bloquear o liberar los receptores para miosina. De la misma forma, la miosina, anclada en la línea M, solo sufre un deslizamiento entre los filamentos de actina, con gasto de energía, y movilidad de su estructura pero sin grandes tracciones que debiliten el filamento.

Sin embargo, la titina, insertada firmemente en la línea Z, y en la M, por sus extremos NH_2 -terminal y COOH -terminal respectivamente (Bennett y cols. 1997) sí que sufre continuamente modificaciones en su longitud con fenómenos de compresión y estiramiento continuo, como ya indicaron Fürst y cols. (1985), siendo pues la molécula físicamente más débil en apariencia, y con más posibilidades para sufrir roturas en la porción más cercana a la línea Z. Es precisamente en esta zona donde encontramos las imágenes que estamos comentando. Que sean un proceso de reparación o destrucción, es difícil de valorar con imágenes estáticas, pero la localización de polirribosomas en la misma localización hace que nos inclinemos más a favor de la reparación.

La porción variable en dimensiones de la molécula de titina, en la región de la banda I, presenta en su composición sucesiones repetidas de aminoácidos con estructura similar a las inmunoglobulinas (Laibet y Kolmerer, 1995), cuya resistencia es menor que la presentada en la región A, demostrando también que el control genético es diferente para cada una de las dos partes de la molécula. Los siguientes pasos para aclarar este proceso de reparación de la inserción en la zona Z, parece que dependen más del estudio fisiológico de capacidad de resistencia y acumulación de tensión en esta molécula, pudiendo así delimitar la cantidad y tiempo de ejercicio capaz de producir lesiones o colaborar en la reparación y rehabilitación del tejido.

15.3.- VARIACIONES EN EL TEJIDO CONJUNTIVO.

Durante el desarrollo de actividades deportivas, no solo aparecen cambios en las fibras musculares sino que todo el músculo se ve afectado por estas variaciones, y parte fundamental de él, es el tejido conjuntivo que rodea cada célula, no solo para proporcionar coherencia mecánica, sino por todo lo que representa en cuanto al emisor y receptor de señales metabólicas y funcionales, a vehículo de inervación y de vascularización. La imagen general que aparece en relación con los grupos control nos habla, en general, de una mayor actividad en este tejido, pero con características diferentes para cada grupo problema.

Ya hemos comentado que este tejido conectivo es esencial para que las fibras musculares puedan transmitir su fuerza contráctil a las estructuras vecinas. La morfología que la célula muscular presenta en estas zonas de contacto con el tejido conjuntivo, sobre todo en los extremos ya ha sido descrito por Muir (1961) y Stickland (1983), aunque ellos no especificaron a qué tipo de fibra correspondían. Schippel y Reissig (1968) describieron la densificación que aparece en las proximidades del tendón y que en mucho menor grado, al referirse solo al endomisio, entre dos células musculares fue estudiado por Hanak y Böck (1971). Para ellos, la lámina basal es más gruesa y en casi continuidad con el colágeno y la reticulina de las proximidades, de forma que se establece una cohesión entre la membrana del miocito, las fibras del endomisio y la sustancia fundamental de este, demostrada desde hace tiempo por Ishikawa (1965).

En nuestros deportistas hemos podido constatar un aumento en la densificación de estas zonas de tejido conjuntivo entre los miocitos. En los atletas de resistencia con tres años de práctica deportiva, llama la atención el aumento de densidad en las zonas contiguas a los extremos de crecimiento de las fibras que no existía antes en las porciones en contacto con zonas medias de las células musculares. Esta modificación

aparece en mayor o menor grado en todos los grupos de atletas por lo que creemos que puede contribuir a la formación de un refuerzo mecánico durante el acortamiento del músculo en la contracción, o bien, puede formar parte de un sistema de señales que contribuyan a acelerar la velocidad de crecimiento longitudinal de las fibras, impuestas por el ejercicio y cuya existencia de momento solo hay sospechas fundadas por el aumento de enzimas implicadas en el metabolismo energético demostradas por numerosos autores (Turto y cols, 1974; Suominen y cols., 1980 y Kovanen y cols. 1980). Para McLennan (1997), la conversión de un tipo de fibra en otro, puede estar bajo la influencia del TGF β 2, producido en el conjuntivo que rodea la fibra.

El número de fibroblastos también aumenta en los deportistas, pero presentan señales de mayor actividad en los grupos con menos tiempo de dedicación al deporte. En sus núcleos alargados también puede verse la imagen de poros nucleares muy marcados y largas prolongaciones con una gran cantidad de organelas citoplásmicas de síntesis proteica que pueden estar implicadas en la fabricación de fibras de colágena o reticulina, o de factores de estimulación para miocitos. La actividad de los fibroblastos de los deportistas de velocidad del grupo V21, es más moderada que en los de resistencia.

La descripción que Sakuma y cols. (1993) hacen de las poblaciones de fibroblastos en ligamentos y fascias musculares de ratas entrenadas para correr, es aplicable directamente a nuestras observaciones sobre morfología de esta población celular, que también presenta forma alargada, con escotaduras y un citoplasma con signos de mayor actividad metabólica.

En esta primera parte de nuestro estudio, a los tres años de desarrollo de la actividad encontramos además, el resto de células propias del tejido conjuntivo, que aparecen regularmente representadas, con algún linfocito extravasado y restos celulares similares a los que acontecen en fenómenos de apoptosis, por lo tanto no parece que sean necesarios en este momento cambios adaptativos importantes.

Los capilares presentan un calibre algo mayor que en los controles, sin aparecer comprimidos y con mayor profusión, tanto en el corte longitudinal como en el transversal, en zonas vértices entre varias fibras, que son a su vez las más espaciosas. Sus endotelios muestran una gran actividad pinocítica. Ya veremos en el apartado correspondiente, que las variaciones de calibre pueden explicarse en relación a los cambios cuantitativos en el aporte máximo de oxígeno, provocado por el ejercicio.

Sin embargo, en los atletas con siete años de vida deportiva, empezamos a ver cambios en este tejido que nos hacen pensar en la necesidad de programar el entrenamiento de forma que se consiga siempre el mayor equilibrio entre la masa muscular y el tejido conjuntivo. Al crecer las fibras musculares, el sitio que puede ocupar el endomisio y perimisio entre ellos, disminuye, de forma que las fibras de la sustancia intercelular se densifican aun más . Por otra parte, la presión de las células musculares sobre los fibroblastos y capilares en cada contracción, puede ser responsable de las imágenes de degeneración de las mitocondrias en los primeros, y del calibre disminuido en los segundos, con mayor número de núcleos endoteliales con signos apoptóticos. Además, el aumento de linfocitos extravasados y la presencia de monocitos y células cebadas a este nivel nos hace pensar en una respuesta inflamatoria de este tejido conjuntivo, sobre todo en los atletas de resistencia.

Lexell y cols. (1983) al estudiar el tejido muscular de una muestra de población humana entre 30 y 75 años, llamaron la atención sobre la compresión que se produce en el tejido conjuntivo cuando va pasando el tiempo y toda la masa muscular se reduce a un proceso de atrofia. Es decir, con la edad la masa muscular disminuye, pero también lo hace el tejido conjuntivo, apareciendo además más cantidad de haces de fibras colágenas que dificulta los procesos de regeneración vascular y nerviosa fisiológicos. Este grupo de autores ampliaron estos datos con enfermos de insuficiencia arterial periférica con daño tisular por isquemia aguda, en los que también detectaron un cierto grado de compresión vascular por parte del tejido conjuntivo adyacente.

Más tarde, el equipo de Sjöström (1982c y 1988) detectó el mismo tipo de proceso con reacción inflamatoria y fenómenos regenerativos, en atletas de resistencia de alta competición, en los que hay mayor compromiso de fibras tipo IIa, que son además las primeras afectadas en la claudicación intermitente. La razón por la que el compromiso es mayor en los atletas de resistencia que en los de velocidad, puede deberse a una mayor rigidez general en las fibras tipo I que en las tipo II, y la única diferencia morfológica podría atribuirse a la presencia de mitocondrias subsarcolémicas y perinucleares en las fibras tipo I, predominantes en los grupos de resistencia, que proporcionasen rigidez a la superficie de la fibra. Mientras que las de tipo II, más numerosas en los deportistas de velocidad, mantendrían un grado de plasticidad y adaptabilidad mayor que las primeras, comprimiendo menos los espacios ocupados por el tejido conjuntivo.

Éstos hechos requieren una mayor profundización en su estudio, para evitar el desarrollo de patologías en los atletas, que puedan acortar su vida deportiva, o suponer un empeoramiento en la calidad de vida posterior al ejercicio competitivo.

16.- ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS CUANTITATIVOS.

Hemos visto que el análisis de las variaciones morfológicas que aparecen en las células musculares humanas, inducidas por la actividad deportiva, aportan conocimientos imprescindibles sobre la naturaleza de estos cambios y su localización precisa, orientándonos además en las relaciones que se establecen entre los distintos compartimentos de la célula y sus organelas. Pero no podemos dejar de cuantificar estas modificaciones, para llegar a conseguir una valoración correcta y precisa de cada hecho. Para ello estudiaremos punto a punto todos los datos que hemos obtenido con el estudio estadístico de los parámetros propuestos en los objetivos, de tal forma que al contrastarlos con las aportaciones de otros grupos de investigadores, nos puedan proporcionar unas conclusiones científicamente válidas.

16.1.- VARIACIONES EN LA PROPORCIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS DE FIBRAS.

Del estudio de los diferentes autores que han aportado datos sobre este tema, se desprende que nuestro organismo es capaz de adoptar el predominio de uno u otro tipo de fibra muscular, en función del tipo de trabajo que se le imponga. Este cambio es lento y progresivo en el tiempo, lo que nos va a permitir valorar si se produce por aumento en el número de elementos contráctiles o por crecimiento de los ya existentes.

16.1.1.- Población control.

En nuestra población control, vemos que al llegar la edad adulta y durante todo el tiempo que estamos considerando, no hay variación en el porcentaje de fibras tipo I (47.1 ± 6.2 y 46.9 ± 5.9), que además son predominantes en el músculo vasto externo, en personas de vida sedentaria, seguidas por las fibras tipo IIa (32.8 ± 5.7 y 34.1 ± 5.4), mientras que los tipos IIb (19.3 ± 6.7 y 19.3 ± 10.0) que estarían en el extremo metabólicamente opuesto, y IIc (0.8 ± 0.5 y 0.8 ± 0.5) aparecen en una proporción considerablemente menor.

Desde el punto de vista de las necesidades que el trabajo mecánico impone durante la vida diaria en nuestro ambiente, este patrón de distribución es funcionalmente lógico y aceptable, ofreciendo la posibilidad de utilizar las fibras tipo I para movimiento prolongado en el tiempo y las tipo IIa para una demanda de emergencia, de forma que el organismo no se viese excesivamente agotado por una larga caminata o por una carrera imprevista.

Estos porcentajes concuerdan con los datos aportados por los trabajos de otros autores como Howald y cols. (1985), con una media de un 48% de fibras tipo I, un 39% para IIa y un 18% para IIb, en el mismo músculo de la población control de su protocolo, o para Tesch y Karlsson (1985) con un $48\pm 6\%$ en el tipo I y Sjoogard (1984) con 45% para ST y del 55% restante, 2/3 para FTa y 1/2 para FTb. También coinciden con lo que Taylor y Bandman (1989) han aceptado como patrón normal, con técnicas de separación electroforética para isoformas de MHC en el vasto lateral, encontrando una expresión de MHC-I $49\pm 18\%$, MHC-IIA y MHC-IIC $35\pm 16\%$ y MHC-IIB $16\pm 10\%$.

Únicamente Staron y cols. (1983) presentan datos diferentes, con un 19'8% para tipo I, 16'0% para IIa y 17'7% para IIb y 12% para IIab. Para estos últimos autores el predominio se mantienen, pero los totales son mucho menores. La técnica utilizada es la misma ATPasa con preincubación a diferentes pH que nosotros hemos utilizado, pero el grupo de Staron llevó a cabo su protocolo tratando de clasificar poblaciones tipo IIab y IIac, incluso despreciando la pequeña cantidad de fibras de tipo IIc, por lo que algunas de las células que normalmente nosotros encuadraríamos en un tipo concreto, para ellos serían fibras mixtas.

Por todo esto creemos que el modelo de distribución porcentual que nosotros hemos obtenido, se adapta al de la mayoría de los autores y es plenamente aceptable, desde un punto de vista metabólico y funcional, para el desarrollo de una vida normal.

16.1.2.- Deportistas de resistencia.

Al comparar los datos de la población control con los deportistas de resistencia, vemos como las fibras tipo I aumentan en un $59\pm 5'7\%$ a los tres años de entrenamiento y continúan hasta el $63'3\pm 4'5\%$ a los 7 años, así como las tipo IIc que pasan a un $2'0\pm 0'7\%$ y $2'7\pm 1'4\%$ respectivamente. Sin embargo, las fibras de contracción rápida IIa y IIb sufren una disminución progresiva a lo largo de todo el tiempo considerado.

El ejercicio prolongado en el tiempo y de intensidad mantenida, propio de los atletas de resistencia, depende en gran medida de las fibras de contracción lenta y de metabolismo aerobio, viendo cómo fisiológicamente son éstas las que responden, aumentando en cantidad, hasta constituir el tipo más numeroso en el vasto externo de este grupo de deportistas.

El trabajo de Tesch y Karlsson (1985) afianza y determina este cambio en la proporción que aparecen los tipos de fibras, comparando canoistas de kajak con corredores, dos deportes de resistencia en los que se utilizan grupos musculares

diferentes de brazos y piernas, en cada uno de ellos. Estudiando los porcentajes en el deltoides y el vasto externo, que originariamente presentan una proporción similar de fibras ST (Billeter 1980), demostraron que en el primer grupo, las fibras tipo I aumentan significativamente en el deltoides, pero en el vasto no hay diferencia con el grupo control, mientras que en los corredores, aumentaban ligeramente en deltoides y hasta un 20% en el vasto externo. Por lo tanto es el tipo de ejercicio lo que condiciona en cada músculo el cambio en la proporción de fibras con diferente rendimiento.

En el protocolo de Howald y cols. (1985), se plantea una proporción de cambio, de solo un 10% de incremento para el tipo I y una disminución de tipo IIb, bastante menor que en nuestro caso, pero ellos solo hacen el seguimiento durante 6 meses de entrenamiento para resistencia. En sus grupos, 9 de los 10 atletas aumentaban las tipo I y solo 7 disminuían las IIb. A lo largo de los 6 meses plantean la transformación de las tipo IIb en IIa durante la primera semana y las IIa en I a las seis semanas de iniciar el ejercicio. Parece evidente que en nuestro grupo, al hacer un seguimiento durante siete años, el cambio incipiente que apuntan estos autores, ya se ha producido y el porcentaje en el tipo de fibras tiende a ser más estable.

Sjoogard (1984), plantea un estudio similar en ciclistas y coincide con nosotros en la proporción de cambio, pero llama la atención sobre el hecho de que dentro de este grupo, los que reciben además una preparación para sprintar, porque estén mejor dotados para ello, llegan a alcanzar un 67% de población tipo I. Este autor considera que el desarrollo de las competiciones ciclistas en la actualidad, pide esfuerzos diferentes dentro de cada prueba, teniendo que recibir un entrenamiento tanto de resistencia como de velocidad.

Otros investigadores intentan justificar estos cambios en los tipos de fibra muscular, fuera de la propia célula, por influencia de la inervación y admiten que el incremento de las primeras está producido por una transformación del estímulo nervioso, que se puede establecer experimentalmente con la estimulación eléctrica de baja frecuencia (Green y cols. 1984). Sjöström y cols. (1988) demostraron que el monótono entrenamiento diario para maratón, somete a los músculos a una situación similar a la estimulación crónica, por lo que la interpretación sobre la influencia del control nervioso justificaría el predominio de las fibras tipo I.

El hecho de que existan lesiones en las fibras nerviosas, mientras discurren por el tejido conjuntivo asociadas a este entrenamiento para grandes y extremas distancias, no debe ser ignorado. Además, las fibras tipo II son más vulnerables en estas circunstancias y, de hecho Sjöström (1980, 1982c y 1988) demostró que la isquemia

aguda afecta primero a las IIb. Pero esta situación puede ser beneficiosa para el tipo de resultado que se desea en este deporte, porque el deterioro en un tipo de fibra que debe disminuir con el tiempo, supone una aceleración en la consecución de niveles óptimos en el porcentaje de las fibras tipo I, para alcanzar antes un mayor rendimiento.

No podemos olvidar la variación de las fibras IIc, que aumentan durante ese mismo tiempo hasta un 140% y 225% en los atletas de resistencia de 21 y 25 años respectivamente, siendo el grupo más llamativamente afectado por este ejercicio, aunque en el valor absoluto de la cantidad de fibras, sigue siendo el menos numeroso.

Este aumento tan llamativo de porcentaje de fibras tipo IIc se puede justificar e interpretar desde dos puntos de vista: por un lado, como célula de metabolismo y velocidad de contracción intermedia, se adapta bien por su dotación enzimática al ejercicio mantenido mucho tiempo, para reforzar el trabajo de las tipo I, e incluso colaborar en los cambios de ritmo al responder en menos tiempo al estímulo que demanda un aumento de velocidad o de fuerza. Por otro lado, si seguimos los trabajos de Abernethy y cols (1990) y aceptamos la posibilidad de cambio de unos tipos de fibra en otros, el aumento de IIc sería reflejo de la disminución de IIa y IIb, que irían cambiando sus isoformas de MHC y MLC, de la forma rápida a la forma lenta, para acabar en las fibras tipo I que se necesitan en esta modalidad deportiva.

16.1.3.- Deportistas de velocidad.

Atendiendo al grupo de velocidad, vemos que al contrario del caso anterior, las fibras tipo I y IIc son las que disminuyen progresivamente, según va avanzando el tiempo dedicado a la práctica deportiva. Las tipo I disminuyen casi en la misma proporción que aumentaban en el caso anterior, con lo que la diferencia entre ambos grupos de deportistas llega ser de hasta un 68% a los 3 años de entrenamiento y de un 116% a los 7. Pero en las IIc la disminución no es tan llamativa como el aumento en la valoración de resistencia. Este cambio puede deberse a que el paso de IIb, a IIa y a I, sea más lento que de I a IIa y IIb, a través de la expresión de MHC-IIx. De hecho, a lo largo del desarrollo, primero se expresan las fibras ST y luego van apareciendo poco a poco las formas de miosinas para fibras FT, por lo que quizá este camino sea el más equilibrado y quede como un patrón de evolución durante toda la vida.

En el caso de los deportistas de velocidad, la demanda es de una gran utilización de toda su masa muscular, casi de forma explosiva, y en muy poco tiempo: necesitan un tipo de fibra muscular que sea capaz de producir una gran cantidad de energía en ese tiempo, aunque también el rápido consumo de sustrato sea responsable de su

facilidad para la fatiga. El tipo de fibra que se necesita para este trabajo es de contracción rápida y metabolismo glicolítico o glicolítico oxidativo. El hecho de que éstas fibras IIa y IIb sean además las más gruesas, puede justificar el aumento de masa muscular y peso por encima de los de resistencia.

Por lo que llevamos estudiado, en todos los trabajos hay una información parcial sobre lo que acontece en cada tipo de fibra y en deportes concretos, dentro de este grupo de utilización de fuerza de manera explosiva, como pueden ser los levantadores de pesas, que además de desarrollar velocidad desarrollan exageradamente su masa muscular. En nuestro caso, con corredores de 100 a 400 m, el desarrollo de la masa muscular es casi tan importante como la de los culturistas y levantadores de peso, pero las proporciones corporales se mantienen más equilibradas.

Si queremos comparar nuestros resultados con los de otros autores, vemos que también son datos irregulares e imprecisos los que aporta la literatura. Los de Allemaier y cols (1994) que utilizan biopsia de vasto lateral y determinan que hay un aumento de fibras tipo IIa y disminución de tipo IIb. Esta diferencia puede deberse al corto tiempo que controla, solo 3 meses y a los entrenamientos mixtos en algunos casos, intercalando programas para velocidad y resistencia.

Andersen y cols. (1994) estudian la expresión de formas de MHC, detectando una disminución de MHC-I y MHC-IIb con un incremento de MHC-IIa. Ellos plantean la disminución de IIb por la presencia de fibras de expresión mixta MHC-IIb-IIa, que dependiendo del nivel del corte en la misma fibra, nos va a dar resultados diferentes. También es menor que el nuestro, el tiempo que valoran, por lo que, si volvemos al planteamiento del cambio de tipo de fibra, todavía no se haya establecido el porcentaje de cada tipo, ideal para este trabajo de velocidad.

Por los trabajos de Schiaffino y cols. (1988) en sóleo de rata, sabemos que las fibras tipo IIa del individuo adulto, tardan más tiempo que las demás en expresar en su totalidad las isoformas MHC-2A, persistiendo en la misma célula la expresión MHCemb y MHCneo. Cuando al animal se le somete a un entrenamiento intensivo para desarrollar fuerza, se acelera la maduración. De la misma forma, en nuestro modelo, la mayor demanda de trabajo intenso, puede hacer que disminuya la represión genética restante y aumente el número de células positivas para MHC-IIa.

De todas formas, aunque en nuestro caso, a largo plazo y comparando con el grupo control, aumentan los dos. Las IIb lo hacen en proporción del 20 y 36% en velocistas de 21 y 25 años y las IIa en un 29 y 35%. Es decir, que el aumento de fibras

FT, cuando la práctica deportiva está ya plenamente establecida, se mantienen en los tipos IIa y IIb en proporción similar al patrón que aparece en sujetos control, por lo tanto creemos que la principal diferencia entre el criterio de los autores consultados y el nuestro, es que no han dejado transcurrir el tiempo necesario para que la transformación de la expresión MHC-IIA o IIB se estabilice.

16.2.- VARIACIONES EN LA SUPERFICIE DE CORTE TRANSVERSAL.

Cuando consideramos las variaciones de la superficie de corte transversal de las fibras musculares de los deportista, vemos siempre un aumento de este parámetro. El hecho ya fue apuntado desde el siglo pasado por Morpurgo (1897), que hace responsable directo del proceso al ejercicio. Los estudios posteriores se orientaron a determinar qué componentes estructurales están implicados en las variaciones y desde los trabajos de Helander (1961) y Goldspink (1964), sabemos que esta hipertrofia se debe a un aumento del material contráctil de la célula, es decir, de las miofibrillas. La causa es conocida por todos desde los trabajos de Ikai y Fukuyama (1970) que lo plantean como un hecho fisiológico: el número de sarcómeras en serie y el tipo de miosina que las compone, es directamente proporcional a la fuerza desarrollada por unidad de área del músculo.

Según los datos aportados por Flear y cols. (1960), el aumento de tamaño de la musculatura, referido al peso, se va produciendo desde el nacimiento hasta la edad adulta y varía en cada músculo considerado, dependiendo de su localización en el organismo y de la función que va a desarrollar. El 85% de este incremento corresponde a las fibras musculares y el 15% restante al aumento paralelo del tejido conjuntivo que le acompaña (Kobayashi y Yonemura, 1967). La cantidad de agua que contiene es de un 90% en el feto y de un 76% en el adulto. Según estos datos fisiológicos, el aumento de peso se debe a un aumento de los elementos celulares que ya hemos apuntado. En el caso de las proteínas, Ling y Kromash (1967) demostraron que puede elevarse hasta 3'5 veces, desde el nacimiento hasta la edad adulta. El incremento de proteínas se traduce en un aumento de tamaño de las células, visible en su superficie de corte.

Hay numerosos datos que apoyan esta teoría, basados sobre todo, en la diferencia positiva de peso que presentan los músculos de personas, que sistemáticamente hacen deporte (Alwais y cols 1989) y que durante toda la vida van a mantener la diferencia de peso, llegando al 58% en ancianos (Iwaoka y cols, 1989) cuando ya se ha invertido el fenómeno de crecimiento, con lo que podemos afirmar que el ejercicio produce un retraso en el proceso de envejecimiento.

En la actualidad y dentro de la inquietud por conseguir una mejor calidad de vida, se están planteando muchos protocolos sobre esta base, como el de Jubrias y cols. (1997), que valoran la superficie de corte de las fibras musculares en hombres y mujeres desde los 23 a los 80 años, utilizando el mismo procedimiento que nosotros y basándose también en biopsias de vasto externo, como herramienta de trabajo homogéneamente significativa. Ellos estudian la relación entre el área encontrada y la fuerza producida y demuestran que mientras la superficie disminuye en un 39% entre los 65 y los 80 años, la fuerza se va perdiendo progresivamente un 1'5% anual, hasta un 21% en total. Por lo tanto, consideran que el mecanismo de atrofia, no es suficiente para explicar la disminución de fuerza y no está tan clara la proporción directa, que relaciona la fuerza con la superficie de corte, según el planteamiento de Ikai y Fukuyama (1970).

Para conciliar ambas teorías, debemos pensar que en el rendimiento de trabajo muscular, no solo interviene el aparato contráctil estructural constituido por las miofibrillas, sino una ingente cantidad de enzimas, que coordinan y dirigen los procesos de despolarización de membranas y transporte de iones a sus lugares de acción, que morfológicamente tienen menos significado estructural, afectando en menor grado a las dimensiones métricas, pero sí un alto significado funcional, en cuanto a la cantidad de fuerza producida. Es decir, las baterías enzimáticas se van deteriorando progresivamente, sin que el efecto se traduzca inmediatamente en la variación del número de sarcómeros, que empiezan a disminuir a partir de un nivel crítico de integridad de los demás parámetros. Dada la edad a la que tienen lugar estos procesos y las de nuestros grupos experimentales, creemos que esta progresiva disminución masa muscular y por lo tanto de fuerza, aunque sean datos a considerar, pueden tener muy poca incidencia en nuestros resultados.

16.2.1.- Variaciones en el grupo control.

Atendiendo a los datos de superficie de corte transversal que se plantean en este apartado, analizamos en primer lugar el grupo control y vemos que el parámetro estudiado permanece prácticamente constante con el paso del tiempo, excepto en las fibras tipo IIc que en los tres últimos años considerados, aumentan su grosor en un 5%, a expensas de una pequeña disminución de las fibras IIa y IIb.

El hecho de que la superficie de corte de la mayoría de las fibras se mantenga constante, nos habla de un grupo de adultos sanos, que han llegado a completar el desarrollo de una musculatura que corresponde fisiológicamente al sedentarismo, y que

además, es un grupo uniforme perfectamente indicado para su finalidad en cuanto a ser utilizado como elemento comparativo en las modificaciones producidas por el ejercicio.

Debemos pararnos a analizar ese incremento del 5% de las fibras tipo IIc entre los 21 y 24 años. Ya sabemos que el aumento de tamaño del músculo durante el crecimiento es un hecho fisiológico, pero este grupo de 21 años ya ha completado su desarrollo, por lo que cualquier variación en el tamaño, estará condicionada por otros factores.

A lo largo de la historia ha habido una tendencia a considerar este tipo de fibras como un elemento de tránsito de unas poblaciones a otras (Brooke y Kaiser, 1973, Schiaffino y Reggiani, 1994) y una de las que primero aparecen en animales jóvenes, en el proceso de diferenciación de las fibras musculares (Brooke y cols. 1971).

Es un hecho demostrado que dentro de cada célula muscular existen dominios nucleares, que producen transcriptos y productos proteico asociados con membranas y miofibrillas, que permanecen en la vecindad de los núcleos responsables de su síntesis (Pavlati y cols., 1989), y que la mayor o menor actividad de cada núcleo, depende de las señales que recibe del microambiente. En las fibras tipo IIc la principal isoforma de MHC que aparece es la MHC-2X, pero también pueden aparecer en menor proporción el resto de isoformas, β /slow, 2A y 2B, propia de las fibras musculares esqueléticas, en una formación híbrida continua, descrita por numerosos autores (Robbins y cols. 1986, Blanchard y cols. 1984, Danielli-Betto y cols. 1986, Smerdu y cols. 1994).

Por otro lado, (Sugiura y cols. 1992) han demostrado en la rata, que con la edad aparece una progresiva disminución de fibras con expresión de isoformas MHC-2B y un aumento paralelo de MHC-2X, en los componentes miofibrilares de los músculos rápidos.

Con todos estos datos podemos deducir que, ante la falta de ejercicio que aparece en el grupo de estudiantes entre los 21 y 25 años, en los que incluso el de tipo lúdico disminuye por la gran demanda de horas de trabajo intelectual, empiezan a producirse variaciones en su tejido muscular, por la falta de uso en esa edad, no tan marcadas como para que se vea afectada significativamente la población tipo IIb, pero sí para que las fibras IIc aumenten su síntesis de proteínas, como forma de reserva para una transformación rápida en otro tipo de fibra, si hay una mayor demanda de ejercicio físico.

16.2.2.- Variaciones en el grupo de deportistas de resistencia.

En el caso de los deportistas que entrenan para resistencia, todos los tipos de fibras aumentan su diámetro con respecto al grupo control, como corresponde a un ejercicio que se va a llevar a cabo durante mucho tiempo y que implica la colaboración sincronizada de prácticamente todos los grupos musculares, pero el mayor aumento lo experimentan las fibras tipo I de contracción lenta (25 y 28%) y en una proporción paralela, las IIc (32%), en las que sigue creciendo la cantidad de miofibrillas durante todo el tiempo considerado. Las fibras tipo IIb (17 y 26%) mantienen también una curva ascendente y constante, pero no tan llamativa como en el caso anterior, y las IIa (7 y 10%) apenas sufren variación con respecto al grupo control.

Las fibras de contracción lenta son las primeras que aparecen en la evolución ontogénica (Rubinstein y Kelly, 1981) y posteriormente empiezan a expresarse las miosinas de las fibras tipo IIb y IIa. Este ejercicio permite pues mantener un patrón típico de formas musculares jóvenes. Debido a la clase de trabajo que van a llevar a cabo, las fibras más necesarias son las que mantienen su actividad al completo con una ATPasa baja o intermedia, a la vez que aprovechan al máximo la capacidad oxidativa de sus grandes mitocondrias.

Dentro de las rápidas, las IIb responden como las de mayor actividad de síntesis en los últimos tres años, aumentando en un 9% mientras que las de tipo I solo un 3% en el mismo periodo. Parece que llegado el momento de madurez en este ejercicio, cuando las fibras lentas ya han alcanzado su actividad máxima, aun pueden mejorar el rendimiento total con el aporte de trabajo de las fibras rápidas más diferenciadas.

Durante esta modalidad de entrenamiento, aparece un reclutamiento progresivo de unidades motoras, demostrado por Lowry y cols. (1980) y Bernardi y cols. (1997), dentro del patrón evolutivo similar al ontogénico: primero activa fibras ST y finalmente las FT.

Parece que la necesidad de mantener un aporte constante de sustrato energético para las largas horas de trabajo muscular, puede llegar a depleccionar el poco glucógeno almacenado en las fibras ST y la habilidad para renovar al ATP que soporta la contracción disminuye, activando entonces las fibras tipo IIb. Estas fibras pueden mantener incluso condiciones anaerobias porque su potencial oxidativo es considerablemente menor que las fibras tipo I, en el hombre sedentario.

16.2.3.- Variaciones en el grupo de deportistas de velocidad.

Los atletas de velocidad presentan un incremento de superficie en corte transversal claramente inclinado hacia las formas rápidas, tanto Ila (11 y 34%) como IIb (17 y 31%), que han aumentando a los tres y continúan haciendolo hasta los siete años y en mayor proporción a favor de las primeras. Las IIc presentan también mayores dimensiones también, pero discretamente y siempre en menor cantidad que en los deportistas de velocidad.

Estos resultados concuerdan completamente con lo que se puede deducir de la bibliografía consultada en cuanto a las necesidades funcionales para desarrollar un esfuerzo de intensidad máxima en un tiempo mínimo. Así los trabajos de Edström y Ekblom (1972), Costill y cols. (1979) y McDougall y cols. (1977) avalan esta hipertrofia de la fibras FT, con aumento significativo en la sección transversal de todas ellas, al contrario de Thorstensson y cols. (1977) que no detectan ninguna variación a las 8 semanas de iniciado el entrenamiento.

Volvemos al mismo punto de poco tiempo de desarrollo del ejercicio, si nos fijamos en nuestras gráficas, el aumento es progresivo no solo a los tres años de inicio, sino que continúa elevándose en este grupo de velocidad en los cuatro años siguientes, de forma más acusada en las fibras tipo Ila. Al ser las fibras tipo Ila las de mayor diámetro en condiciones normales, además de las que más aumentan en grosor, seguidas por las IIb, los músculos de estos deportistas son los que alcanzan mayores dimensiones y mayor peso, bastante por encima que los músculos de los atletas de resistencia, con una masa muscular delgada a partir de la puesta en forma ideal. Debido a la velocidad a la que se desarrolla la fuerza, el resto de fibras debe contrarrestar la fuerza de la gravedad, justificando el discreto aumento de las fibras tipo I.

Este aumento tan marcado de las fibras FT, está producido porque el número de contracciones máximas y rápidas en serie, del entrenamiento de estos atletas, hace que respondan primero y con más intensidad las fibras rápidas, por lo que la tensión que se produce en sus líneas Z es mayor y más repetida, originando mayor número de roturas que facilitan el aumento en grosor de estas poblaciones celulares.

16.3.- VARIACIONES CUANTITATIVAS EN LA DOTACIÓN MITOCONDRIAL.

El estudio del diferente modo de utilización de los músculos dedicados a locomoción en personas sedentarias y deportistas, nos ha aportado ya muchos datos

sobre los cambios inducidos en ellos por el ejercicio. Si nos paramos a pensar en la forma en que esta maquinaria consume energía para su funcionamiento, es indispensable plantearnos dentro de este estudio, cómo varían las distintas vías de las que dispone el músculo para conseguirla, almacenarla, utilizarla y reponerla.

Algunos de estos puntos ya los hemos ido mencionando en los apartados correspondientes, tanto morfológicos como funcionales, pero nos queda analizar los resultados aportados por la valoración cuantitativa de la densidad de volumen mitocondrial en cada tipo de fibra y en cada actividad deportiva, así como su relación con procesos metabólicos, que aunque se salen de nuestro campo por pertenecer al apartado de fisiología, han sido aportados por otros autores, permitiendonos contar con sus resultados, para interpretaciones analíticas y base de posibles hipótesis.

La relación entre el volumen de las mitocondrias y el volumen de las fibras, varía notablemente de un músculo a otro. En algunas especies de animales, en los músculos utilizados para la locomoción, ésta oscila entre el 2 y el 6%, mientras que en el diafragma alcanza el 10 o 12%, pero, como demostraron Ogata y Murata (1969), las diferencias que existen en la distribución, forma y tamaño de las mitocondrias, también varían según la especie considerada y en el caso concreto del hombre, estas diferencias se suavizan.

El músculo esquelético humano de tipo mixto, como el que nosotros estamos utilizando en nuestro trabajo, presenta una relación volumen de mitocondrias/volumen de fibras, cuantificada en un 3% en sujetos no entrenados específicamente. Por efecto del entrenamiento, en cualquiera de sus formas, Prampero (1990) demostró que esta relación aumenta acercándose al 4-5% de volumen de las fibras, tanto en las tipo I como en las tipo II, con características diferentes dependiendo del músculo, tipo de ejercicio y tiempo dedicado a él.

Estos datos admitidos por la generalidad de los autores consultados, discrepan de las primeras aportaciones de McDougall y cols, (1979) que sostienen que al aumentar la cantidad de proteínas contráctiles, se produce una dilución de las mitocondrias, con disminución de la densidad. Parece que esta diferencia puede deberse al modo de llevar a cabo el análisis morfométrico, que él realizó con un método indirecto, valorando capacidades metabólicas, al contrario que el resto de los trabajos, incluido el nuestro, en los que se visualizan directamente con microscopía electrónica los parámetros métricos de esta organela.

16.3.1.- Variaciones en la población control.

En este punto vemos que existen diferencias cuando tenemos en cuenta el paso del tiempo, ya que excepto en las mitocondrias de las fibras tipo IIc, cuya densidad no varía, tanto las tipo I como las tipo IIa y IIb sufren variaciones que hacen necesaria la comparación parcial de resultados con los grupos de deportistas. Así vemos que las mitocondrias en las fibras tipo I aumentan de los 21 a los 25 años desde $2'9 \pm 0'5$ a $3'1 \pm 1'0\%$ y las IIa y IIb disminuyen de $2'7 \pm 0'5$ a $2'2 \pm 0'7\%$ y de $1'8 \pm 0'3$ a $1'6 \pm 0'6\%$ respectivamente. Por lo tanto tenemos que analizar dos hechos: el aumento de densidad del volumen mitocondrial en fibras tipo I del 7% y la disminución en IIa del 19% y IIb del 11%, en personas de vida sedentaria entre los 21 y 25 años y la mayor densidad de las IIc sobre las I en ambos grupos.

Apenas hemos encontrado datos comparativos para explicar y contrastar estos hechos en la bibliografía consultada, por lo que debemos atenernos únicamente a nuestra propia interpretación, apoyada en algunos datos relativos a adaptación en la inmovilización prolongada.

Como veremos más adelante, existe la tendencia a considerar que el aumento de volumen mitocondrial, provocado por el ejercicio, es un hecho paralelo al aumento de tamaño de las fibras (Staron y cols. 1983), pero en nuestro caso estamos valorando la población control y las pequeñas oscilaciones que se producen en cuanto al aumento de superficie de corte transversal, no son en absoluto significativas, excepto en las fibras tipo IIc que habíamos apuntado con un crecimiento del 5%, por lo que no resulta un criterio de referencia útil.

Staron y cols. (1984) también nos hablan de esta disminución del volumen mitocondrial, en las fibras tipo IIb de su grupo control, y lo justifican considerándolo como una consecuencia de la inactividad. También los trabajos de Ferretti y cols. (1997) muestran una disminución de densidad de volumen mitocondrial del 16'5% después de un periodo de inmovilización forzada de 42 días, con una disminución de enzimas oxidativas del 11%.

Rantanen y cols. (1994), confirman que en el envejecimiento la diferencia de distribución de los distintos tipos de fibras, va disminuyendo, con desaparición progresiva de las fibras tipo II y predominio de las I y IIc, de menor tamaño y sin diferencia significativa entre los dos sexos, modificando el patrón de respuesta oxidativa, con mayor dependencia aerobia, tanto en la vida diaria, como en el ejercicio. Este dato ha sido ampliamente estudiado por Schiaffino y Reggiani (1996), demostrando que

existe una tendencia progresiva con la edad a retornar a un patrón de distribución en el que predominen las fibras ST, y que las variaciones oxidativas preceden a veces los cambios morfológicos que las soportan, como es el número y tamaño de las mitocondrias.

La teoría de la dilución mitocondrial cuando aumenta el tamaño de las fibras, de McDougall y cols. (1979), llevando a una disminución de la capacidad enzimática de estas fibras, tendría cabida aquí en cuanto a explicar que unas células que se utilizan poco en la vida sedentaria de los estudiantes, como son las FT, mantengan unos niveles oxidativos en disminución, aun antes de que se produzca el cambio de expresión de isoformas de MHC-IIA, IIB, a MHC-X y MHC-I por la edad. Sobre todo si pensamos en sentido inverso al ejercicio, es decir, el desuso produciría primero cambios bioquímicos, que actuarían como señales para inducir una forma de expresión, que se manifieste en cambios morfológicos adecuados para el trabajo que desempeñan. Esta forma de interpretación explica también el aumento de densidad en las fibras tipo I, que son las de utilización preferente en sujetos sedentarios, precediendo el aumento metabólico al aumento en su número y tamaño, considerando la superficie total de un músculo dado.

Como idea final de estas reflexiones, llegamos a la tristemente conocida falta de actividad de la mayoría de los estudiantes que utilizamos en este estudio como grupo control, que en realidad tiene consecuencias importantes en cuanto a un envejecimiento prematuro de su masa muscular.

16.3.2.- Variaciones en los deportistas de resistencia.

Esta modalidad deportiva totalmente aeróbica, es la que lógicamente estimula más los cambios positivos en la dotación mitocondrial, y así podemos ver cómo en todos los tipos de fibras, la densidad es mayor si la comparamos con sujetos control, e incluso en casi todas las comparaciones con los deportistas de velocidad. También se aprecia cómo el tiempo de dedicación al deporte influye en el aumento de esta organela celular en todas las fibras musculares.

En el caso de las fibras tipo I, este aumento en la densidad de volumen mitocondrial era de esperar a la vista del aumento importante que sufren las fibras, tanto en porcentaje como en superficie de corte transversal, de forma que a los tres años de práctica deportiva, la diferencia con el grupo control es de un 28%, llegando a los siete años al 39%. Por lo tanto, al mantener la dedicación, sigue equilibrando el metabolismo, para conseguir superarse en un 16% entre los dos estadios que consideramos. Lo mismo sucede con las fibras tipo IIc, que aumentan considerablemente la capacidad

oxidativa durante la realización de este deporte, de forma paralela al aumento de sus dimensiones, hasta llegar a superar en un 44% a las fibras IIc del grupo control.

El resto de fibras, IIa y IIb, que habitualmente mantienen un tipo de metabolismo glicolítico, aumentan también su grosor, pero disminuyen su proporción a lo largo de la práctica deportiva. Sin embargo, vemos también en ellas un incremento en la densidad de volumen mitocondrial, aunque tarda bastante más en producirse y nunca llega a tener en valor absoluto la importancia numérica que aparece en las tipo I y IIc. Las fibras IIa, a los tres años de realización de este trabajo muscular, no se diferencian en densidad mitocondrial de las de los controles, llegando a experimentar después de ese momento y hasta los 25 años, el mayor incremento proporcional de todas las fibras, un 68%, con respecto a su grupo control. Para el grupo IIb, el proceso de cambio metabólico es progresivo desde el primer momento, hasta superar en un 50% a su grupo control al final de nuestra valoración.

Podríamos pensar que este aumento tan llamativo, proporcionalmente el mayor que hemos encontrado, aunque no en valor absolutos que correspondería a las fibras tipo I, sería utilizado para apoyar el trabajo de estas fibras eminentemente oxidativas, para llevar a cabo todo el proceso de gasto y reposición energética del metabolismo aeróbico en estos atletas.

Estos cambios con el entrenamiento para resistencia han sido analizados por numerosos autores, con resultados similares a los nuestros, tanto en el hombre como en otras especies animales, como Jansson y Kaijser (1977) y Bylund-Fellenius (1977) que utilizando diferentes protocolos, llegan a conclusiones similares, valorando el aumento de volumen mitocondrial hasta en cuatro veces en las fibras FT y dos veces y media en las ST. Kayar y cols (1986) en ratas con estimulación para resistencia, cuantifican el aumento en un 50% superior con respecto al grupo control, y Sukova y cols. (1991) hallan un incremento del 9'2% en el vasto externo humano, acompañado de un incremento significativo de las enzimas mitocondriales implicadas en el metabolismo oxidativo.

Wang y cols. (1993) en el mismo músculo que nosotros hemos utilizado, y con 18 meses de entrenamiento, hablan de un aumento en valor absoluto del volumen de las mitocondrias en todas las fibras, pero siempre manteniendo la proporción en cuanto a las variaciones de tamaño de cada tipo de fibra. El porcentaje de volumen mitocondrial en fibras tipo II de corredores y culturistas fue similar y significativamente más alta que en los controles.

En nuestro trabajo vemos que este aumento no es paralelo en todos los casos, puesto que la superficie de corte transversal en los atletas de resistencia, aumenta significativamente en todos los tipos de fibras, aunque en menor proporción en las FT, mientras que la densidad mitocondrial aumenta en las tipo I y IIc y en las IIa y IIb, permanece igual a los tres años, para aumentar después a los siete. Estas aparentes diferencias entre los dos resultados las hemos comentado ya, al detectar en el grupo de Wang, un aumento de las fibras tipo I y IIa, que interpretábamos como una medida en un tiempo prematuro para que se estabilizaran los porcentajes de los diferentes tipos de fibras y que en nuestros deportistas empezábamos a considerar a partir de los tres años.

De la misma forma, puede que el establecimiento de patrones metabólicos claramente oxidativos, tarde más tiempo en llevarse a cabo que el que estos autores han considerado, ya que ellos mismos afirman que el análisis enzimático indica que el músculo incrementa su capacidad de fosforilación oxidativa, según va disminuyendo su porcentaje de fibras tipo IIb. Parece que las fibras tipo II que son primariamente glicolíticas, con el efecto del entrenamiento pueden desarrollar un alto nivel oxidativo, sin interrumpir la jerarquía de la capacidad metabólica ($I > IIa > IIb$). Sin embargo, debe haber algún punto en el que la utilización dicte una alteración de la molécula de miosina dentro de la población de subtipos de FT.

16.3.3.- Variaciones en los deportistas de velocidad.

Con respecto al grupo de deportistas entrenados para pruebas de velocidad, es de esperar que mejoren sus capacidades glicolíticas, puesto que hemos visto que son precisamente estas fibras FT las que aumentan tanto en superficie de corte como en porcentaje, por tanto sus variaciones en dotación mitocondrial sería inferior al grupo que hemos comentado en el apartado anterior.

Las fibras tipo I, oxidativas, disminuyen en porcentaje según va pasando el tiempo, pero aumentan en diámetro, de forma que este aumento de tamaño condiciona un incremento de densidad mitocondrial, similar al que se observa en los deportistas de resistencia y que igualmente se mantiene en el tiempo hasta llegar a un 14% más entre los 21 y 25 años. En las fibras IIc, intermedias, oxidativas y glicolíticas, el contenido mitocondrial no varía en relación a los controles, a pesar del aumento de grosor. La disminución del porcentaje IIc en velocidad, hace que la proporción con respecto al volumen de esta organela en las fibras de los atletas de resistencia, llegue a ser inferior al 40% a los 7 años.

Ambos datos concuerdan con los presentados por autores como Costill y cols. (1979) y Staron y cols. (1984), en los estudios que llevaron a cabo en los levantadores de peso. Jansson y cols. (1978) y Schantz y cols. (1982) estudian la variación en el número de mitocondrias de las fibras tipo IIc, en función del planteamiento de células de transición. Es decir, al ir convirtiéndose en glicolíticas para transición a fibras tipo IIa, van disminuyendo sus mitocondrias, sobre todo en sus localizaciones subsarcolémicas y perinucleares, para llegar al patrón de distribución intermiofibrilar más ordenado de éstas últimas.

Por último, en las fibras FT, vemos un fenómeno parecido al que describíamos en el grupo de resistencia, con porcentajes parecidos en los dos grupos. El aumento de densidad aparece muy lentamente en IIa, mientras se está produciendo el lento aumento en diámetro y número de fibras de este grupo, pero en el momento de rápido incremento de la fibra tanto en tamaño como en número, la densidad de volumen mitocondrial aumenta rápidamente, hasta presentar un 5% más alto que en los controles de la misma edad. En el caso de las IIb tiene lugar un incremento similar en cuanto a su manifestación, pero llega a ser un 44% mayor que en los controles de 25 años.

Esta diferencia en la densidad de volumen mitocondrial entre las fibras tipo IIa y IIb en este grupo de velocidad, podría ser superponible a la idea de McDougall y cols. (1979) en cuanto a la dilución mitocondrial, de forma que las que más aumentan en tamaño, menos aumentan en esta organela. Pero hemos de tener en cuenta que las fibras tipo IIb son las que primero presentan una depleción glicolítica en los deportistas de velocidad, que depende de la intensidad y tiempo de realización del ejercicio, por lo tanto, como ya demostraron Essen (1978), Green (1978) y Thomson y cols. (1979), con el entrenamiento, esta población celular debe desarrollar mecanismo oxidativos compensatorios, en mayor medida que las tipo IIa. Por lo tanto, y de acuerdo con el planteamiento de Staron y cols (1984), el entrenamiento para velocidad contribuye a incrementar la capacidad oxidativa total del músculo, sin que se afecte significativamente el máximo consumo de O_2 .

Aunque hablamos de incrementos importantes en las fibras tipo I, son siempre referidas a densidad de volumen mitocondrial en relación al volumen de la fibra, y por tanto, en valor absoluto, el mayor incremento lo sufren las fibras IIa y IIb, que a pesar de mantener un metabolismo eminentemente glicolítico, aumenta también su potencial oxidativo, como importantes herramientas de apoyo a su gasto energético. Estos hechos tienen su imagen histoquímica paralela en las técnicas para enzimas mitocondriales como la SDH que nosotros hemos mostrado en los resultados como dato comparativo

al estudio morfométrico y, que como Oda y cols. (1958) habían demostrado, está absolutamente limitado a las mitocondrias.

En rasgos generales los datos que hemos obtenido en nuestro trabajo, concuerdan con los de Baldwin y cols. (1973) y Saltin y cols. (1976) que durante el estudio de la respuesta adaptativa al ejercicio de velocidad, obtienen un aumento significativo de enzimas mitocondriales, demostrando mayores sustratos NADH y SDH, como respuesta al alto y rápido consumo de O₂ que se produce con este tipo de deporte. Más recientemente, Sukhova y cols (1991) determinan la densidad de volumen mitocondrial en vasto lateral en sprinters, valorándolo en un 7'6%, pero no especifican localizaciones dentro de la célula, ni porcentajes en los diferentes tipos de fibras.

16.4.- VARIACIONES EN LA DENSIDAD DE CAPILARES.

Los datos que nos aporta la revisión bibliográfica en cuanto a los cambios que sufren los capilares que nutren la fibra muscular, en respuesta al ejercicio, son contradictorios según el autor considerado, bien porque afirman categóricamente que aumentan en número y densidad (Ingjer, 1978, Bell y Jacobs, 1990, Kuzon y cols. 1990) o que disminuyen en alguno de estos parámetros (Nygaard y Nielsen, 1982; Luque y cols, 1995). Lo que está claro en todos ellos, y nosotros nos unimos a este criterio, es que el árbol vascular va a adaptarse a la nueva situación, colaborando para mantener un flujo sanguíneo adecuado, que garantice la buena oxigenación y nutrición de cada tipo de fibra, y en general, está plenamente aceptado el aumento de capilares en el músculo con el ejercicio. Este aumento no hace más que confirmar sobre el plano cuantitativo, el dato conocido desde hace tiempo en cuanto a que los animales domésticos, en condiciones de relativa inactividad, tienen una menor densidad de capilares musculares, que los que se detectan en las especies homólogas que viven en libertad.

En el extremo opuesto, el efecto de la inactividad sobre los capilares del músculo humano, es menos conocido, pero sí es importante que primero se aprecia una disminución de la superficie de corte transversal de las fibras y luego una disminución en el número de capilares, es decir, los capilares se adaptan a las necesidades de las fibras musculares.

Ya hemos comentado en el apartado correspondiente, que existen diferencias fisiológicas importantes entre los índices de capilaridad de los músculos lentos (soleo), rápidos (EDL) o mixtos (vasto externo), porque el número de capilares que rodea cada tipo de fibra, es diferente dependiendo del tamaño del músculo en cada especie

considerada, de su grado de desarrollo y de su velocidad de contracción (Hudlickä, 1980). La diferencia en el aporte capilar entre fibras ST y FT en el músculo esquelético humano, es algo distinta de lo que se ha visto en otras especies y creemos que puede estar influenciado por el potencial oxidativo de los dos tipos de fibras. En el conejo y hámster, Peter y cols. (1972) demostraron que la proporción es de 2/3 entre el número de fibras oxidativas y glicolíticas y la misma relación aparece entre los capilares relacionados con cada uno de los subtipos fibrilares. Pero en el hombre esta misma comparación tiene un valor de 1'6 (Essen 1979). Por lo tanto el flujo capilar en las fibras ST y FT, es similar en el hombre, pero no en otras especies y también es compatible con los datos aportados por Sjogaard (1982), que demuestra el hecho de que el potencial metabólico de ambas fibras sea más parecido que en otras especies.

Sin embargo, estas diferencias no son apreciables cuando los índices se relacionan con el tamaño de la fibra muscular (Boreham y cols., 1988) o cuando se valora la capacidad oxidativa con la capilaridad (Hoppeler y cols 1983): las fibras FT tienen menos capilares por fibra, pero su capacidad oxidativa también es menor, y por lo tanto el rendimiento es el mismo que proporciona el mayor número de vasos en las fibras ST (Boreham, 1988). Concretamente en nuestro caso, al ser un músculo mixto, un mismo capilar puede estar rodeado por diferentes tipos de fibras y estar en contacto con parte de la superficie de membrana de una FT y de otra ST, por lo que el trabajar con datos de número de capilares en relación al número de fibras, no aportaría resultados interpretativamente válidos, y hemos preferido trabajar en todos los casos con densidad capilar, es decir, número de capilares/mm² de fibra muscular.

Ya habíamos comentado que durante el periodo de crecimiento y desarrollo humano, el músculo aumenta en tamaño en relación inversa al número de capilares (Boreham, 1988), pero el aumento de tamaño del músculo, con el inicio del ejercicio intenso y programado, ya no guarda relación con el equilibrio homeostático del individuo, para que la musculatura esté al servicio de las necesidades sedentarias, sino que impone sus propias reglas y poco a poco va favoreciendo la organización de una nueva morfología, para una nueva función.

Sabemos que los capilares tienden a mantener la relación capilar/fibra constante y empiezan a desarrollarse antes de que lo hagan los enzimas oxidativos y que la angiogénesis se inicia por señales químicas, debidas a la acumulación de metabolitos provocados por la hipoxia que origina el ejercicio intenso (Flugevand y Segal 1997), pero en este momento no están identificados ni cuantificados estos factores, que pueden derivar tanto de señales del tejido conjuntivo, como del propio endotelio sometido a cambios mecánicos y de transporte de forma violenta (Hudlickä, 1984), o de la fibra

muscular, con el conjunto de anomalías y daño celular que ya hemos expuesto (Lexell, 1983), como mecanismo inicial de cambios para adaptarse al ejercicio.

Tampoco se conocen los factores que determinan el número y la distribución de los capilares alrededor de la fibra muscular durante el desarrollo, pero se ha propuesto que puede ser la propia distribución de los organelas de las células musculares las que produzcan señales químicas para inducir la localización final de los capilares (Poole y Mathieu-Costello, 1996), y dentro de estas organelas, la situación de las mitocondrias en cada tipo de fibra puede tener una implicación especial, que en nuestro caso parecen lógicas y comentaremos más adelante.

16.4.1.- Población control.

Analizando los resultados obtenidos en el estudio de la densidad capilar de cada grupo del protocolo experimental, vemos que en los controles no hay una variación significativa, dentro del periodo de tiempo que hemos seguido, y los valores obtenidos ($277,1 \pm 82,5$ y $300,2 \pm 96,0$) son similares a los aportados por otros autores, en análogas condiciones (Kuzon y cols. 1990, Sjogaard, 1984, Ingjer 1979, Andersen y Henriksson 1977). Las diferencias que puedan existir a lo largo del tiempo en porcentaje de fibras, superficie de corte transversal y densidad del volumen mitocondrial, no son de suficiente envergadura como para producir cambios en la vascularización y por tanto en el aporte de O_2 .

El primer dato que salta a la vista al comparar este grupo control con cualquiera de los otros grupos considerados, es el aumento llamativo de hasta un 104% en el caso de los deportistas de resistencia y un 95% en los de velocidad en el número de capilares/ mm^2 de fibra muscular. Por lo tanto, está clara la relación que existe entre la práctica deportiva y el aumento de vascularización de la musculatura, al contrario de lo que sucede, como ya hemos mencionado, durante el crecimiento y desarrollo fisiológico del músculo, en los que Sillau y Bancho (1978) determinaron que la densidad de capilares por unidad de área disminuye, según va aumentando la longitud y el diámetro de la población de células musculares.

Sabemos que este hecho es debido a la propia maduración del tejido, que según Aquin y cols. (1980) estabiliza la concentración de pigmentos respiratorios dentro de la célula, de forma que aunque exista una mayor distancia desde el capilar al centro de las células, la difusión de oxígeno y elementos nutritivos esté garantizada por estos mecanismos compensatorios. En la actualidad se está estudiando también la relación

que existe entre el aporte capilar y el metabolismo propio de cada tipo de fibra, que se puede plantear en paralelo a las variaciones del volumen mitocondrial.

16.4.2.- Deportistas de resistencia.

El aumento del 50 y 104% que experimentan los capilares en los deportistas de resistencia de 21 y 25 años respectivamente, nos permite ver que con esta modalidad deportiva, el lecho capilar sufre un aumento progresivo constante, igual que habíamos visto en el aumento de la superficie y el número de fibras tipo I y IIc. Sabemos que la relación entre el número de capilares que rodea cada fibra, varía dependiendo del tipo de fibra y así, mientras las fibras rápidas tienen de 2 a 3 capilares por fibra, las lentas pueden tener 3 o 4 capilares a su alrededor (Prampero, 1990), en el caso de músculos mixtos, como el que estamos valorando. Por lo tanto, el incremento final que obtenemos en los ciclistas que llevan ya siete años entrenando, debe ser el mayor de todos, porque este tipo de deporte hace que aumenten precisamente en número y tamaño, las fibras lentas y así vemos que nuestros resultados concuerdan con este planteamiento y el grupo de resistencia con siete años de práctica deportiva presenta un 4% más de capilares que el grupo equivalente, dedicado a velocidad.

Esta interpretación puede estar en desacuerdo con el planteamiento de Ahmed y cols (1997) que afirman que el aumento de densidad está siempre en función del cambio de tamaño de las fibras, pero no del tipo de fibra. Aun así, no es contradictoria, si pensamos que la superficie de las fibras tipo IIa y IIb, también aumenta en este proceso, aunque su porcentaje disminuye.

Entre los autores consultados, Wang y cols. (1993) no encuentran variaciones en densidad capilar en un grupo similar al nuestro, pero ellos solo valoran la diferencia durante 18 meses, y ya hemos visto que en este caso el incremento es progresivo más con el tiempo que con el esfuerzo, por lo que no es un estudio válido para compararlo con nuestros resultados. Sin embargo, Kuzon (1990) trabajando con jugadores de fútbol playa, sí encuentra un aumento tanto en número, de $4'9 \pm 0'4$ a $5'7 \pm 0'9$, como en densidad, de $220'8 \pm 38$ a $282'7 \pm 42$, a los dos años de práctica deportiva. Siguiendo el mismo planteamiento, McCall y col. (1996) encuentra un cambio en el número y la densidad capilar, proporcional al cambio de las fibras tipo I.

En el modelo experimental propuesto por Sjoogard (1984), dentro del mismo deporte que nosotros estamos considerando, demuestra que el número de capilares es mayor, cuando en el entrenamiento para resistencia se incluyen diferentes grados de intensidad, como puede ser considerar un grupo de ciclistas de competición de élite, y

otro grupo de entrenamiento y dedicación menos intensa, pero igualmente organizada y con participación en pruebas de menor envergadura. Los datos obtenidos en su estudio (509 capilares/mm² en el primer grupo y 380 capilares/mm² en el segundo), pueden ser plenamente equivalentes a los de nuestros dos grupos, en los que varía sólo el tiempo de realización del deporte, manteniendo la misma dedicación y tipo de competición. En ambos casos, la densidad de capilares es mayor en ST, acompañando el predominio de este tipo de fibra.

El efecto negativo de este deporte llevado al extremo, como Sjöström y su equipo (1982c y 1987) demostraron en corredores de maratón, ya lo hemos comentado anteriormente, con una alteración por compresión en el tejido conjuntivo que repercute en los vasos, provocando una insuficiencia arterial periférica. No sabemos si esto mismo puede ocurrir en ciclistas dedicados más años al deporte, pero en el grupo R25 solo aparece una mayor densidad en el tejido conjuntivo y una disminución de calibre, aunque no del número, de los capilares que rodean las fibras musculares, que podría ser el inicio del cuadro patológico.

16.4.3.- Deportista de velocidad.

El cambio en el número de capilares en los atletas de velocidad, se manifiesta también como un incremento más rápido y mantenido y vemos que desde los tres años de práctica deportiva para velocidad, el aumento es considerablemente mayor que en el grupo equivalente de resistencia. Llegado a este punto, ya no hay aumento significativo entre los tres y los siete años de desarrollo de esta modalidad deportiva.

De los datos aportados por Mizumo y Secher (1989), se desprende que las fibras tipo IIa, son las que, ante un trabajo incrementado, pueden llegar a presentar mayor capilaridad. Es precisamente este grupo de fibras, seguidas de las tipo IIb, las que más aumentan, en porcentaje y en superficie de corte, dentro del grupo de velocidad de nuestro protocolo. También sabemos que este aumento es similar en ambos sexos, dentro de un mismo deporte, como demostraron Bell y Jacobs (1990) en un grupo de culturistas, pero ellos solo encuentran diferencias en cuanto al número de capilares/fibra, y no en cuanto a la densidad capilar.

Hepple y cols. (1997) llevan a cabo un estudio en deportistas de velocidad en condiciones de diferente aporte de O₂ y observan que, aunque las fibras más implicadas en este proceso sean las de metabolismo glicolítico, el número de capilares aumenta en ambas condiciones, mientras que la densidad capilar solo lo hace en condiciones aerobias. Esta posible explicación sobre las diferencias obtenidas en los resultados de

diferentes autores, muestra además una significativa correlación entre el cambio en el aporte capilar y el VO_2 máximo.

Otra explicación al fenómeno del aumento más rápido de la densidad capilar en los deportistas de velocidad, podemos encontrarla entre líneas, si interpretamos los trabajos del grupo de Sjöström (1980 y 1982c), sobre las alteraciones musculares en la claudicación intermitente. Ellos demuestran que pacientes con isquemia incompleta y reconstrucción vascular quirúrgica, muestran signos metabólicos de lesión tisular, que están en relación con las fibras tipo II. En este proceso hay una relación directa entre el número de fibras IIa y la distancia que el paciente es capaz de recorrer, antes de que se manifiesten los síntomas. Todo esto apunta a que la mayoría de las fibras tipo IIa, son las que primero sufren el daño y disminuyen su tamaño. Por eso en el extremo opuesto, en los deportistas de velocidad, como las IIa son las que más y primero aumentan, es necesario que el número de capilares suba ya desde los primeros estadios.

La forma en que aumenta la densidad capilar en este grupo de nuestro protocolo, alcanzando más del 90% a los tres años y hasta el 95% a los siete años, está en consonancia con las variaciones cuantitativas de las fibras: las tipo II aumentan extraordinariamente los primeros tres años en porcentaje y superficie de corte y por lo tanto, van a necesitar un aumento de capilares, mientras que las tipo I disminuyen en los mismos tiempos, siendo además las fibras que en teoría presentan mayor número de capilares a su alrededor, lo que podría justificar la estabilización en la vascularización con el paso del tiempo, para mantener el equilibrio entre las variaciones de ambos tipos de fibras.

Pero según los trabajos de Ahmed y cols. (1997), que ya hemos apuntado en el comentario sobre atletas de resistencia, el aumento en el número de capilares producido por el ejercicio, está en relación con el incremento en el tamaño de las fibras y no con el tipo de fibra. Luego también es lógico que en los velocistas aumente desde el primer estadio considerado, porque son precisamente las fibras tipo IIa y IIb las de mayor tamaño previo y las que más aumentan en superficie de corte. También hemos visto que la masa muscular total es mayor en los deportista de velocidad que en los de resistencia, luego su alto número de capilares, aun manteniendo el criterio de que metabólicamente necesitan menos aporte vascular, es un resultado plenamente justificado y aceptable.

Después de estas comparaciones, podemos pensar que el ejercicio no es una ampliación de la función que el músculo realiza cotidianamente, sino un nuevo trabajo,

no absolutamente necesario para la vida, pero sí para mantener una mejora en la calidad del resto de los tejidos y del suyo propio. Llevado a extremos de alta competición puede originar patologías que se deben evitar con una correcta ejecución de programas de entrenamientos personalizados, con posibilidad de hacerlos extensibles a toda la población para una correcta calidad de vida.

17.- ADAPTABILIDAD DE LA FIBRA MUSCULAR ESTRIADA ESQUELÉTICA: CAMBIOS EN EL FENOTIPO

Una de las cuestiones principales que conciernen a la adaptabilidad del músculo esquelético, es la posibilidad de cambiar la proporción del tipo de fibras que lo componen. El tema, de la existencia de un cambio en los tipos de fibras, no está resuelto todavía y el hecho de relacionar este punto con el crecimiento postnatal hipertrófico e hiperplásico, es un problema que ha originado numerosos estudios, que hemos venido enunciando y analizando en cada punto de nuestro trabajo.

El músculo esquelético está clasificado en base a sus propiedades contráctiles y puede ser identificado por métodos morfológicos, histoquímicos, inmunológicos, electroforéticos y por caracterización bioquímica de sus proteínas. Con todas estas herramientas se va avanzando en la comprensión de los cambios que tienen lugar en estas fibras, como consecuencia de un cambio en su trabajo mecánico, que también puede ser útil para comprender el resto de las situaciones que implican un cambio similar.

En la actualidad, la investigación del genoma expresado por las células musculares y las correspondientes proteínas que codifican, están siendo elementos claves para ir despejando progresivamente estas incógnitas (Moore y cols. 1992). El descubrimiento de las familias isogénicas para las proteínas que estructuran la sarcómera, ha servido de explicación a la diferente forma de comportamiento de cada tipo de fibra.

El por qué cada músculo tiene un patrón predominante de distribución de los diferentes tipos de fibras, es el resultado de un proceso evolutivo que en cada especie va adaptando la forma a la función que deberá realizar y viceversa (Ordahl y Le Douarin, 1992). Pero este patrón puede ser modificado por elementos patógenos, experimentales como la estimulación eléctrica a diferentes frecuencias y por medio del ejercicio o la inmovilización. Dependiendo de los resultados, el nuevo patrón puede ser beneficioso o no, para la vida del individuo.

En el embrión, las futuras fibras musculares están determinadas antes de emigrar a su localización definitiva, donde forman primero fibras lentas, para después salir a escena las rápidas, en el esbozo muscular. Es decir, antes de emigrar, las células embrionarias han adquirido un compromiso hacia el miembro donde formarán las fibras primarias lentas y rápidas (Hauschka, 1974). Este resultado muestra que el compromiso celular tiene un gran peso en el desarrollo del linaje celular y por ello, la teoría de Stockdale (1992) sugiere que la diversidad de fibras debe ser considerada como el compromiso prioritario para la formación de los diferentes tipos de fibras.

La primera de las situaciones de mutación en este tejido, está suficientemente comprobada y es un proceso fisiológico, que tiene lugar durante la maduración después del nacimiento. En este momento la mayoría de las células musculares son ST y algunas de ellas deben ir cambiando hasta la forma FT (Drachman y Johnston, 1973). La velocidad a la que se lleva a cabo este cambio de isoformas, depende de la especie que estemos considerando (Buller y cols., 1960, 1965).

Una vez pasada la época fetal, después del nacimiento, parece que existe un acuerdo generalizado sobre la no existencia de mioblastos y por supuesto, desde los últimos estadios de vida fetal, no se evidencia ninguna actividad mitótica, ni separación longitudinal de las fibras ya formadas (McCallum y cols 1898).

Por todos estos datos y las observaciones morfológicas en las zonas de crecimiento, pensamos que el aumento que hemos ido describiendo en nuestras muestras de tejido muscular de los diferentes atletas, se debe únicamente a un proceso hipertrófico, puesto que en ningún momento hemos detectado la presencia de células en mitosis, ni en núcleos de miocitos, ni en células satélites, como tampoco hemos encontrado datos ultraestructurales que confirmen la incorporación de células satélites a la estructura del miocito adyacente, cuya lámina basal comparte.

De esto se deduce que el incremento en el número de fibras en el corte, depende única y exclusivamente del crecimiento longitudinal de éstas, de forma que al avanzar se van interponiendo unas entre otras, dando a la sección un aspecto de mayor densidad celular (Williams y Goldspink, 1971; Rosser y cols., 1995). Si además es un tipo concreto de fibra el que crece, el resultado final es que este tipo aparece en un mayor número de cortes sucesivos, por lo que el porcentaje final aumenta.

La coincidencia morfológica y funcional de las organelas que componen cada tipo de fibra, en cuanto a la distribución de mitocondrias con respecto a las miofibrillas y al sistema de membranas, la cantidad de enzimas oxidativas o glicolíticas, la forma de

crecimiento de las miofibrillas, etc., propias de cada tipo de fibra, ya sea ST o FT, nos habla de un control y expresión nuclear muy preciso y mucho más amplio de lo que supone pensar solamente en controlar la producción de un tipo de proteínas para una sarcómera determinada, llevándonos a pensar que la reserva de la capacidad evolutiva de los núcleos de las células musculares, después del nacimiento, es mucho mayor de lo que en un principio se había planteado (Schiaffino y Reggiani, 1996).

Estos núcleos están capacitados para controlar un volumen citoplásmico mucho mayor que el conseguido al nacimiento. Es decir, desde el nacimiento a la edad adulta, el músculo sigue creciendo y cada núcleo debe controlar una zona mayor de citoplasma, y esto sucede con toda normalidad, sin ningún compromiso en la relación establecida. Pero si además tiene lugar un crecimiento por estimulación dinámica a través del deporte, los mismos núcleos son capaces de controlar un mayor volumen citoplásmico con más cantidad de organelas, por el crecimiento que experimenta la célula.

Si esto es posible, las células satélite, al contrario de lo propuesto por Moss y Leblond (1971), Hubber y cols. (1985) y Robertson y cols. (1992), entre otros autores, no estarían implicadas tan directamente en estos procesos de crecimiento, aunque no podemos asegurar que no dispongan de un sistema de participar en mecanismos reparadores, porque no hemos profundizado en este punto que se sale de nuestro cometido. En nuestro caso, ya hemos comentado que en ningún momento hemos visto imágenes de mitosis o incorporación al miocito, en esta población celular, debiendo establecerse una nueva línea de estudio que aclare las relaciones que pueden establecerse entre las dos poblaciones celulares y las señales utilizadas entre ellas, en el caso del crecimiento del tejido muscular con el ejercicio.

El otro punto conflictivo en cuanto a la posible variación real de un tipo de fibra a otro, cambiando las proteínas que componen las sarcómeras y por tanto, el resto de las organelas que intervienen en la contracción, está siendo objeto en la actualidad de múltiples estudios.

El punto inicial de este cambio, es decir, si es el ejercicio el que actúa directamente sobre la fibra, o es a través del sistema nervioso, al aumentar o disminuir el tipo y la intensidad de estímulos para la contracción, cambiando por tanto la estructura de la placa motora, tan definida para cada tipo de fibra como nos había hecho ver Ogata y Yamasaki (1985), es uno de los campos de investigación de la fisiología que tampoco están resueltos en la actualidad. La transición postnatal desde formas MHCneo a MHCs o MHCf, es independiente de la innervación y ocurre también en músculos denervados (Russell y cols. 1988). De todas formas, un núcleo de vida tan larga como el muscular,

debe tener al menos tanta autonomía en su autocontrol, como la célula nerviosa, de forma que una y otra puedan coordinar sus funciones, sin que se llegue a producir un absoluto control en la evolución del músculo desde el sistema nervioso.

La composición bioquímica y el resto de proteínas sarcoméricas que caracterizan a cada una de las fibras de contracción rápida o lenta, las proporciona una identificación bioquímica absolutamente específica (Brooke y Kaiser, 1970; Staron e Hikida, 1992; Santana-Pereira y cols. 1997), pero a pesar de que la clasificación es correcta, es necesario tener en cuenta que las fibras musculares presentan una gran capacidad de adaptación y por lo tanto numerosas variedades intermedias.

Teniendo en cuenta únicamente las cadenas pesadas de las miosinas, algunas fibras musculares contienen una variedad de isoformas particulares de MHC, que no permiten tipificarlas de forma rutinaria. A pesar de que la principal distribución de fibras lentas y rápidas están establecidas en el nacimiento, a lo largo de la existencia tienen lugar ingeniosas modificaciones que parecen asociadas a distintos niveles hormonales o de actividad en cada edad.

El cambio de las isoformas parece un proceso lento, que se va desarrollando en diferentes partes de la célula muscular, dependiendo de cómo cada núcleo va cambiando su expresión génica, desde la previa existente, hasta la nueva que necesita y de ahí la existencia del continuo de isoformas coexistentes que se presenta en algunos estudios y que bien podía estar relacionado con formas morfológicas mixtas, tanto en el corte transversal como en el longitudinal. Su existencia estaría representada por las formas intermedias Ic, Ilc, Ilac, Ilab, en cuya existencia Staron viene insistiendo en sus trabajos (1990-1997).

Según esto, el cambio se produce, pero es mucho más lento que el que habíamos visto como final de la diferenciación postnatal, como puede verse por el tiempo que tardan en producirse en nuestro trabajo. La sucesión de hechos implica en primer lugar, una demanda diferente de actividad, capaz de originar una alteración metabólica. En un músculo sano, la respuesta lógica es la puesta en marcha de los mecanismos oportunos para una adaptación funcional, con emisión de señales que demanden un cambio en el soporte morfológico. Para que varíe la morfología, debe haber un cambio de expresión de DNA, que transcriba diferentes RNAm y RNAs, como elementos que nos llevan por fin a la síntesis de las nuevas isoformas proteicas. Su distribución será responsable de la nueva forma, impuesta por su variación metabólica.

Sin embargo, son pocas las células que se ven con características morfológicas intermedias, que pudieran considerarse como el soporte formal de estas variaciones bioquímicas. Para llegar a determinar estos cambios, sería necesario llevar a cabo un estudio con tomas de muestras en estadíos más próximos entre sí, aunque no sea en humanos, para evitar un gran número de microcicatrices en el músculo, que pueden hacer variar los resultados.

Si el cambio en la expresión de isoformas es posible y fácil, no importa la proporción del tipo de fibras musculares al nacimiento, previo a la elección de un deporte. Evidentemente el rendimiento óptimo se alcanzará antes, cuando el individuo muestre un predominio de isoformas correcto para el ejercicio elegido, pero con programas de entrenamiento adecuado, puede conseguirse el cambio requerido para cada modalidad deportiva.

**c
o
n
c
l
u
s
i
o
n
e
s**

18.- CONCLUSIONES.

1.- Las células musculares del vasto externo humano, en todos los grupos de nuestro protocolo, presentan unas características morfoestructurales y un patrón de distribución de los diferentes tipos de fibras, que se adapta al admitido como normal.

2.- La práctica deportiva continuada, es responsable de los cambios morfológicos que aparecen en las fibras del músculo vasto externo de los atletas estudiados, donde encontramos signos de hipertrofia, con crecimiento longitudinal y transversal.

2.1.- Existen datos de crecimiento longitudinal en los extremos de las fibras musculares tipo I de los atletas de resistencia con tres años de práctica deportiva, que incluyen la localización de núcleos y organelas citoplásmicas implicadas en la formación de miofilamentos, para integrarse en las sarcómeras distales incompletas. En los atletas de resistencia con siete años de dedicación al deporte, aparecen zonas de compresión entre los extremos longitudinales de las distintas células que distorsionan esta zona de crecimiento.

Las tipo II de los atletas de velocidad, crecen en forma roma, con una mayor cantidad de núcleos alineados en el extremo de crecimiento longitudinal, bajo el sarcolema de la célula, y sin que aparezcan fenómenos de compresión en los deportistas de mayor edad.

2.2.- Las imágenes que encontramos en la zona intermedia de las células, y que corresponden a mecanismos de crecimiento transversal, por división de las miofibrillas, son diferentes según se produzca en las fibras tipo I o tipo II, de forma que en los deportistas de resistencia predomina el mecanismo de división en la línea media y posterior bifurcación de las miofibrillas, propio de las fibras tipo I, mientras que en las muestras de los deportistas de velocidad, la imagen más frecuente es la de roturas en varios puntos de la línea Z, que al avanzar provoca la rotura de las miofibrillas de forma irregular.

Acompañando estas variaciones, se aprecian los cambios correspondientes al retículo sarcoplásmico y túbulos transversos, implicados en la despolarización y el recambio iónico propios de la contracción muscular, así como de las mitocondrias que van a aportar la energía necesaria para ello.

3.- No hemos encontrado ninguna imagen de crecimiento hiperplásico que afecte a miocitos o células satélites, en las muestras de todos los grupos estudiados.

Las células satélites de las fibras musculares de los grupos control y de los deportistas, de resistencia y de velocidad, presentan una morfología normal y establecen con la membrana celular de los miocitos un estrecho contacto, pero no hemos encontrado imágenes de fusión entre ambas células. En los grupos de atletas se localizan con mayor frecuencia en las proximidades de los núcleos de miocitos, sobre todo en zonas de crecimiento de esta célula.

4.- El desarrollo de programas de entrenamiento deportivo, imponen en las fibras musculares cambios metabólicos que tienen representación morfológica en estudios con microscopía electrónica de transmisión.

4.1.- Las mitocondrias de las fibras tipo I de los atletas de resistencia, aumentan en número en todas las localizaciones en las zonas de crecimiento. En los extremos aparecen acúmulos intermiofibrilares, que pasan a ser columnas de un elemento al ir avanzando a la zona media de las células. Los acúmulos subsarcolémicos y perinucleares son más llamativos que en el grupo control. Las fibras tipo IIc de este mismo grupo de atletas, muestra un aumento de zonas subsarcolémicas con mitocondrias alineadas, y mayor número de columnas intermiofibrilares.

En el caso de los atletas de velocidad, varían más las fibras tipo II, cuya zona de crecimiento distal es la única que presenta acúmulos de mitocondrias, y las intermiofibrilares se muestran más regularmente distribuidas y son de mayor tamaño que en los estudiantes del grupo control.

4.2.- La distribución de los gránulos de glucógeno, es principalmente intermiofibrilar, y aumenta en todos los deportistas con el paso del tiempo, pero su imagen se va haciendo más constante en las fibras tipo II de los atletas de velocidad.

4.3.- Los acúmulos de gotas lipídicas aumentan en todos los grupos de deportistas, pero en diferente proporción, siendo más llamativos en las fibras tipo I de los atletas de resistencia, tanto a los tres años, como a los siete de práctica deportiva. En las fibras de este grupo, también aparecen en zonas perinucleares restos lipídicos degenerativos en cuerpos residuales. En los atletas de velocidad, la presencia de gotas de grasa, es algo mayor que en el grupo control, pero siempre en pequeñas cantidades.

5.- El tejido conjuntivo que se localiza entre las fibras musculares, y que constituye el endomisio, también se ve afectado por los cambios inducidos por la práctica deportiva. En los atletas de resistencia, las fibras de colágeno y reticulina son más numerosas y se presentan en haces más compactos, sobre todo en los extremos

de crecimiento, que proporcionan al corte un aspecto de compromiso espacial. Aumentan también el número y la actividad de las células propias de este tejido, en función del tiempo de práctica deportiva. En los atletas de velocidad, el espacio interfibrilar es más reducido que en los controles, pero la cantidad de fibras colágenas es menos llamativa que en el caso anterior, sin encontrar células deformadas entre ellas.

6.- La demanda de O_2 que lleva aparejada la práctica deportiva, induce también cambios en la vascularización de este músculo. En los deportistas de ambos grupos con tres años de práctica deportiva, aumentan ligeramente en número y su calibre es igual o algo inferior al de los controles, sobre todo en el grupo de resistencia. A los siete años de entrenamiento regular, si hay mayores diferencias entre ellos y con el grupo control. Así vemos que el número de capilares sigue aumentando en ambos, pero los de los deportistas de resistencia, presentan desviaciones en su trayecto, provocadas por la mayor rigidez del tejido circundante.

7.- El entrenamiento deportivo, en cualquiera de sus formas, impone en el tejido muscular implicado en el proceso, una serie de cambios funcionales, que están encaminados a conseguir el grado de adaptación necesario, para lograr un rendimiento óptimo.

8.- Las técnicas deportivas encaminadas a la competición de resistencia o de velocidad, determinan un cambio en la proporción de las distintas poblaciones de fibras celulares, de forma que van a aumentar o disminuir aquellas cuya presencia o ausencia suponga una mejora en el rendimiento del deporte elegido.

8.1.- En los grupos de resistencia, las fibras que más actividad presentan son aquellas capaces de soportar un trabajo muscular durante mucho tiempo, con intensidad variable, y serán las de contracción lenta y metabolismo aerobio las más indicadas para ello. Por lo tanto, las fibras tipo I, incrementan su número con el paso del tiempo, mientras va disminuyendo la proporción de las tipo IIa y IIb.

8.2.- En los atletas de velocidad, se requiere un tipo de fibra capaz de desarrollar una fuerza máxima en la menor cantidad de tiempo, es decir, hace falta una fibra de contracción rápida y metabolismo glicolítico o glicolítico oxidativo. El fenómeno parece inverso, detectando un mayor número de las fibras tipo IIa y IIb.

9.- El aumento de trabajo impuesto a las fibras musculares con el ejercicio, va a determinar en ellas una serie de variaciones en su estructura que dan como resultado

cambios en el tamaño de su superficie de corte transversal, es decir, un fenómeno de hipertrofia de sus componentes.

9.1.- En los atletas de resistencia, aumenta la superficie de todas las fibras que lo componen, pero en mayor proporción en comparación con los controles, las tipo I y IIc.

9.2.- En los atletas de velocidad, el incremento de la superficie de corte de las fibras tipo I y IIc, es menor que las de los IIa y IIb, que alcanzan las mayores dimensiones de todos los grupos estudiados.

10.- La cuantificación del volumen mitocondrial en relación al volumen de cada tipo de fibra, proporciona datos que confirman las variaciones morfológicas que hemos descrito, y sobre todo muestran la influencia directa que tiene la actividad deportiva en el aumento del metabolismo oxidativo.

10.1.- Al estudiar este parámetro, encontramos diferencias en el grupo control, con aumento en la densidad de volumen mitocondrial de las fibras tipo I, mantenimiento de las IIc y disminución de las tipo IIa y IIb. Por lo tanto, la vida sedentaria también impone cambios en el metabolismo de las fibras musculares.

10.2.- El grupo de atletas de resistencia aumenta el volumen mitocondrial desde el primer momento en todos los tipos de fibras, pero debemos tener en cuenta que el aumento en número y tamaño de las tipo I, proporcionan un mayor incremento en valor absoluto en esta organela.

10.3.- En los deportistas de velocidad, la variación que experimentan en los primeros tres años, es similar a la de los atletas de resistencia de la misma edad, pero a los siete años, es menor en las fibras tipo I y IIc que en el grupo anterior. La aparente diferencia de las fibras IIa y IIb entre los dos grupos, debemos considerarla también en cuanto a un mayor volumen celular.

11.- El tejido muscular implicado en un ejercicio sistematizado, aumenta su densidad capilar, para asegurar el aporte de O_2 necesario para el mantenimiento de su función.

11.1.- Los atletas dedicados al deporte de resistencia, presentan un aumento en el número de capilares por unidad de fibra, desde el primer estadio considerado, llegando a los siete años a presentar el mayor aumento de todos los grupos estudiados.

11.2.- Los atletas de velocidad presentan un rápido incremento en el primer estadio, para ir estabilizándose según va avanzando el tiempo de dedicación al deporte.

12.- De todas estas conclusiones se desprende una final, la gran capacidad de adaptación que presenta el tejido muscular ante los cambios en el trabajo que debe realizar. Estas transformaciones están condicionadas por la posibilidad de variaciones en el fenotipo de sus poblaciones fibrilares.

Por tanto, el aumento en los distintos parámetros estudiados entre unos y otros tipos de fibras, en cada grupo del protocolo propuesto, puede deberse tanto al crecimiento de las fibras con mayor implicación en cada deporte, o al cambio en el fenotipo de la población menos necesaria.

B i b l i o g r a f í a

19.- BIBLIOGRAFÍA.

- * ABE, H., KOMIYA, T. y OBINATA, T.: "Expression of multiple troponin T variants in neonatal chicken breast muscle". *Dev. Biol.* 118:42-51 (1986).
- * ABERNETHY, J.P., THAYER, R. y TAYLOR, A.W.: "Acute and chronic responses of skeletal muscle to endurance and sprint exercise". *Sports Med.* 10:365-389 (1990).
- * ADAL, M.N.: "The fine structure of the sensory region of cat muscle spindles". *J. Ultrastruct. Res.* 26:332-354 (1969).
- * ADAMS, C. y cols.: "Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training". *J. Appl. Physiol.* 74:911-915 (1993).
- * ADRIAN, R.H.; CONSTANTIN, L.L. y PEACHEY, L.D.: "Radial spread of contraction in muscle fibres". *J. Physiol. London* 204:231-257 (1969).
- * AHERNE, W. y cols.: "Muscle fibre size in normal infants, children and adolescents". *J. Neurol. Sci.* 14:171-182 (1971).
- * AHLBORG, B. y cols.: "Muscle glycogen and muscle electrolytes during prolonged physical exercise in man". *Acta Physiol. Scand.* 70:127-142 (1967).
- * AHMED, S.K. y cols.: "Is human skeletal muscle capillary supply modelled according to fibre size or fibre type?". *Exp. Physiol.* 82:231-234 (1997).
- * AITKEN, J.C., BENNET, W.M. y THOMPSON, J.: "The effects of high intensity training upon respiratory gas exchanges during fixed term maximal incremental exercise in man". *Eur. J. Appl Physiol.* 58:717-721 (1989).
- * ALLEMEIER, C.A. y cols.: "Effects of sprint cycle training on human skeletal muscle". *J. Appl. Physiol.* 77:2385-2390 (1994).
- * ALLINGER, T.L.; HERZOG, W. y EPSTEIN, M.: "Force-length properties in stable skeletal muscle fibers-theoretical considerations". *J. Biochem.* 29:1235-1240 (1996).
- * ALOISI, M., MUSSINI, I. y SCHIAFFINO, S.: "Activation of muscle nuclei in denervation and hypertrophy". In: *Basic research in myology*, Kakulas, B.A., Ed., Excerpta Medica, Amsterdam, part 1, pp. 338-342 (1973).
- * ALWAY, S.E., MACDOUGALL, J.D. y SALE, D.G.: "Contractile adaptations in the human triceps sural after isometric exercise". *J. Appl. Physiol.* 66:2725-2732 (1989).
- * ALWAY, S.E. y cols.: "Contrasts in muscle and myofibers of the elite male and female bodybuilders". *J. Appl Physiol.* 67:24-31 (1989).
- * ANDERSEN, J.L. y cols.: "Myosin heavy chain isoforms in single fibres from m. vastus lateralis of soccer players: effects of strength-training". *Act. Physiol. Scand.* 150:21-26 (1994).
- * ANDERSEN, P.: "Capillary density in skeletal muscle of man". *Acta Physiol. Scand.* 95:203-205 (1975).
- * ANDERSEN, P., y HENRIKSSON, J.: "Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise". *J. Physiol. Lond.* 270:677-690 (1977).
- * ANDERSEN, P. y KROESE, A.J.: "Capillary supply in soleus and gastrocnemius muscles of man". *Pluegers Arch.* 375:245-249 (1978).
- * ANDERSSON-CEDERGREN, E.: "Ultrastructure of motor end-plate and sarcoplasmic components of mouse skeletal muscle fiber as revealed by three-dimensional reconstructions from serial sections". *J. Ultrastr. Res. Suppl* 1:1-191 (1959).
- * ANLANSOON, A. y cols.: "Muscle morphology anzyme activity and muscle strength in elderly men and woman". *Clin. Physiol.* 1:73-86 (1981).
- * APPELEYARD, S.T. y cols.: "Monoclonal antibodies detect a spectrin-like protein in normal and dystrophic human skeletal muscle". *Proc. Nat. Acad. Sc.(USA)* 81:776 (1984).

- * AQUIN, L. y cols.: "Growth and skeletal muscle microvasculature in the guinea pig". *Microvascular. Res.* 20:41-50 (1980).
- * ARMEND, O. y cols.: "Origin of satellite cells in avian skeletal muscle". *Arch. Anat. Microsc.* 72:163-189 (1983).
- * ARMSTRONG, R.B. y cols.: "Glycogen depletion in rat skeletal muscle fibers at different intensities and durations of exercise". *Pfluegers Arch.* 352:243-256 (1974).
- * ASTRAND, P.Q.: "Fisiología del esfuerzo humano". *El Médico* 1-12:106-112 (1990).
- * BAGSHAW, C.R. y cols.: "Oxygen exchange in the γ -phosphoryl group of protein-bound ATP during Mg^{2+} -dependent adenosine triphosphatase activity of myosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:2592-2596 (1975).
- * BAKER, S.J. y HARDY, L.: "Effects of high intensity canoeing training on fibre area and fibre type in the latissimus dorsi muscle". *Br. J. Sports Med.* 23:23-26 (1989).
- * BALDWIN, K.M. y cols.: "Glycolytic enzymes in different types of skeletal muscle: adaptation to exercise". *Am. J. Physiol.* 225: 962-966 (1973).
- * BALDWIN, K.M. y cols.: "Biochemical properties of overloaded fast-twitch skeletal muscle". *J. Appl. Physiol.* 52:467-472 (1982).
- * BALDWIN, K.M. y WINDER, W.W.: "Adaptative response in different types of muscle to endurance exercise". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 301:411-423 (1977).
- * BANDMAN, E.: "Contractile protein isoforms in muscle development". *Dev. Biol.* 154:273-283 (1992).
- * BANGSBO, J. y COLS.: "Elevated muscle glycogen and anaerobic energy production during exhaustive exercise in man". *J. Physiol. Lond.* 451:205-227 (1992).
- * BÁRÁNY, M. y CLOSE, R.I.: "The transformation of myosin in cross-innervated rat muscles". *J. Physiol. London* 213:455-474 (1971).
- * BARKER, D.: "The innervation of the muscle spindle". *Quart. J. Micr. Sci.* 89:143-186 (1948).
- * BARKER, D., STACEY, M.J. y ADAL, M.N.: "Fusimotor innervation in the cat" *Phil. Trans. B.* 258:315-346 (1970).
- * BARLOW, T.E., HAIGH, A.L. y WALDER, D.N.: "Evidence for two vascular pathways in skeletal muscle". *Clin. Sci.* 20:367-385 (1961).
- * BARNARD, R.J. y cols.: "Histochemical, biochemical and contractile properties of red, white, and intermediate fibers". *Am. J. Physiol.* 220:410-414 (1971).
- * BEAMS, H.W. y EVANS, T.C.: "Electron micrographs of motor end-plates". *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 82:344-346 (1953).
- * BECKETT, E.B. y BOURNE, G.H.: "Histochemical observations on the cytochrome oxidase and succinic dehydrogenase activity of normal and diseased human muscle". *Act. Anat. (Basel).* 33:289 (1958).
- * BEHR, T. y cols.: "Myofibrillogenesis in primary tissue cultures of adult human skeletal muscle: expression of desmin, titin and nebulin". *Clin. Invest.* 72:150-155 (1994).
- * BELL, D.G. y JACOBS, I.: "Muscle fibre area, fibre type and capillarization in male and female body builders". *Can. J. Sports Sci.* 15:115-119 (1990).
- * BENNET, H.S.: "The structure of striated muscle". In "The structure and function of muscle". (Ed. G. H. Bourne), vol 1, Structure, Chap. 6 (Acad. Press, N.Y.) (1960).
- * BENNETT, H.S. y PORTER, K.R.: "An electron microscope study of sectioned breast muscle of the domestic fowl". *Amer. J. Anat.* 93:61 (1953).
- * BENNETT, P.M. y cols.: "The ultrastructural location of C-protein and H-protein in rabbit muscle". *J. Muscle Res. Cell Motil.* 7:550-567 (1986).
- * BENNETT, P.M., HODKIN, T.E. y HAWKINS, C.: "Evidence that the tandem Ig domains near the end of the muscle thick filament form an inelastic part

- of the I-band titin". *J. Struct. Biol.* 120:93-104 (1997).
- * BENSLEY, R.R. y HOERR, N.L.: "Studies on cell structure by the freezing-drying method". *Anat. Rec.* 60:449 (1934).
- * BERGSTRÖM, J.: "Muscle electrolytes in man determined by neutron activation analysis on needle biopsy specimen: a study in normal subjects, kidney patients, and patients with chronic diarrhoea". *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 14:(Supplement 68) 1-110 (1962).
- * BERGSTRÖM, J., GUARNIERI, G. y HULTMAN, E.: "Changes in muscle water and electrolytes during exercise". En: *Limiting factors of physical performance*, pp. 173-178. Ed. Keul J. Georg Thieme, Stuttgart (1973).
- * BERNARDI, M.; SOLOMONOW, M. y BARATTA, R.V.: "Motor unit recruitment strategy of antagonist muscle pair during linearly increasing contraction". *Electrom. Clin. Neurophysiol.* 37:3-12 (1997).
- * BERSHITSKY, S.Y. y cols.: "Muscle force in generated by myosin heads stereospecifically attached to actin". *Nature* 388:186-190 (1997).
- * BILLETER, R. y cols.: "Myosin types in human skeletal muscle fibers". *Histochemistry* 65:249-259 (1980).
- * BILLETER, R. y HOPPELER, H.: "Basis of muscle contraction". *Schweiz Z. Med. Traumatol.* 2:6-20 (1994).
- * BIRAL, D. y cols.: "Myosin heavy chain composition of single fibres from normal human muscle". *Biochem. J.* 250:307-308 (1988).
- * BISCHOFF, R.: "Activation and proliferation of muscle satellite cells on isolated fibers". *J. Cell Biol.* 91:342a (1983).
- * BISCHOFF, R.: "A satellite cell mitogen from crushed adult muscle". *Dev. Biol.* 115:140-147 (1986).
- * BLANCHARD, A., OHANIAN, V. y CRITCHLEY, D.: "The structure and function of α -actinin". *J. Muscle Res. Cell Motil.* 10:280-289 (1989).
- * BOEKE, J.: "Die motorische Endplatte bei den höheren Vertebrate, ihre Entwicklung, Form und Zusammenhang mit der Muskelfaser". *Anat. Anz.* 35:193-226 (1910).
- * BOLTSHAUSER, E., LANG, W. y VARGA, E.: "Erfahrungen mit der perkutanen nadel-muskelbiopsie in der padiatrie: alternative zur offenen biopsie?". *Schweiz. Med. Wschr.* 166:396-399 (1986).
- * BÓNILLA, E.: "Ultrastructural study of the muscle cell surface". *J. Ultrastruc. Res.* 82:341-345 (1983).
- * BOREHAM, C.A.G. y cols.: "Effects of ageing and chronic dietary restriction on the morphology of fast and slow muscles of the rat". *J. Anat.* 157:11-125 (1988).
- * BOWMAN, W.: "On the minute structure and movement of voluntary muscle". *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 130:457-501 (1840).
- * BOYD, I.A.: "The tenuissimus muscle in the cat". *J. Physiol. (London)* 133:35-36 (1956).
- * BOYD, I.A.: "The diameter and distribution of the nuclear bag and nuclear chain muscle fibres in the muscle spindles of the cat". *J. Physiol. (London)* 153:23-24 (1960).
- * BRIGGS, R.T., SCORDILIS, S.P. y POWELL, J.A.: "Myofibrillogenesis in rodent skeletal muscle in vitro: two pathways involving thick filament aggregates". *Tissue Cell* 27:91-104 (1995).
- * BROOKE, M.H. y ENGEL, W.K.: "The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types. IV. Children's biopsies". *Neurol.* 19:591-605 (1969).
- * BROOKE, M.H. y KAISER, K.K.: "Muscle fibre types: how many what kind?". *Arch. Neurol. (Chicago)*. 23:369-379 (1970).
- * BROOKE, H.M. y KAISER, K.K.: "Use and abuse of muscle histochemistry". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1973).

- * BROOKE, M.H., WILLIAMSON, E. y KAISER, K.K.: "The behavior of four fiber types in developing and reinnervated muscle". *Arch. Neurol.(Chicago)*. 25:360-366 (1971).
- * BROSAMLE, C. y KUFFLER, D.P.: "Rapid dispersal of clustered postsynaptic nuclei following dissociation of skeletal muscle fibers". *J. Exp. Biol.* 199:2359-2367 (1996).
- * BUCHTHAL, F., KAMIENIECKA, Z. y SCHMALBRUCH, H.: "Fibre types in normal and diseased human muscles and their physiological correlates". In: *Exploratory Concepts in Muscular Dystrophy II*. Amsterdam: Excerpta Med. p. 526-551 (Int. Congr. Ser. 333) (1974).
- * BUCHTHAL, F. y SCHMALBRUCH, H.: "Motor unit of mammalian muscle". *Physiol. Rev.* 60:90-142 (1980).
- * BULLARD, H.H.: "Histological as related to physiological and chemical differences in certain muscles of the cat". *Johns Hopk. Hosp. Reports*. 18:323 (1919).
- * BULLER, A.J., ECCLES, J.C. y ECCLES, R.M.: "Differentiation of fast and slow muscles in the cat hind limb". *J. Physiol. London*. 150:399-416 (1960).
- * BULLER, A.J. y LEWIS, D.M.: "Further observations on the differentiation of skeletal muscles in the kitten hind limb". *J. Physiol. Lond.* 176:355-370 (1965).
- * BUÑO, W y GERMINO, N.I.: "Distribution of succino dehydrogenase in the organs of the adult albino rats". *Act. Anat.(Basel)*. 33:161 (1958).
- * BURKE, R.E. y cols.: "Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius". *Science*. 174:709-712 (1971).
- * BURKE, R.E. y TSAIRIS, P.: "Anatomy and innervation ratios in motor units of cat gastrocnemius". *J. Physiol., Lond.* 234:749-765 (1973).
- * BURKE, E.R. y cols.: "Characteristics of skeletal muscle in competitive cyclists". *Med. Sc. Sports* 9:109-112 (1977).
- * BUTLER-BROWNE, G.S. y cols.: "Denervation of newborn rat muscles does not block the appearance of adult fast myosin heavy chain". *Nature Lond.* 299:830-833 (1982).
- * BUTLER-BROWNE, G.S. y WHALEN, R.G.: "Myosin isozyme transitions occurring during the postnatal development on the rat soleus muscle". *Dev. Biol.* 102:324-334 (1984).
- * BUTLER-BROWNE, G.S. y cols.: "Adult human masseter muscle fibers express myosin isozymes characteristic of development". *Muscle Nerve* 11:610-620 (1988).
- * BYLUND-FELLENUS, A.C.: "Physical training in man. Skeletal muscle metabolism in relation to muscle morphology and running ability". *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 36: 151-169 (1977).
- * CAMPION, D.R.: "The muscle satellite cell: A review". *Int. Rev. Cytol.* 87:225-251 (1984).
- * CAMPION, D.R., MARKS, H.L. y RICHARDSON, L.R.: "An analysis of satellite cell content in the semimembranosus muscle of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) selected for rapid growth". *Acta Anat.* 112:9-13 (1982).
- * CANNON, J.G. y COLS.: "Increased interleukin 1 beta in human skeletal muscle after exercise". *Am. J. Physiol.* 257:451-455 (1989).
- * CARRARO, F. y cols.: "Effect of exercise and recovery on muscle protein synthesis in human subjects". *J. Physiol.* 259:470-476 (1990).
- * CASTILLO, J. y KATZ, B.: "Local activity at a depolarized nerve-muscle junction". *J. Physiol. London*. 128:396-411 (1955).
- * CASTILLO, J. y KATZ, B.: "Biophysical aspects of neuro-muscular transmission". *Progr. Biophys. and Biophys. Chem.* 6:121-170 (1956).
- * CHANCE, B. y WILLIAMS, C.R.: "The respiratory chain and oxidative phosphorylation". *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 17:65-134 (1956).
- * CHEVALLIER, A.: "Etude de la migration des cellules somatiques dans le mésoderme somatopleural de l'évauche de l'aile". *Wilhelm*

- Roux *Entwicklungsmechan. Org. Arch.* 184:57-73 (1978).
- * CHEVALLIER, A., KIENY, M. y MAUGER, A.: "Limb-somite relationship: origin of the limb musculature". *J. Embryol. Exp. Morphol.* 41:243-258 (1977).
- * CHIQUET, M., EPPENBERGER, H.M. y TURNER, D.C.: "Muscle morphogenesis: evidence for and organizing function of exogenous fibronectin". *Dev. Biol.* 88:220-235 (1981).
- * CHOU, S.M. y NONAKA, I.: "Satellite cells and muscle regeneration in diseased human skeletal muscles". *J. Neurol. Sci.* 34:131-145 (1977).
- * CIACCIO, G.V.: "La découverte des muscles blancs et des muscles rouges, chez la lapin, revendiquée en faveur de S. Lorenzini". *Archives Italiennes de Biologie* 30:287 (1898).
- * CIFUENTES-DIAZ, C. y cols.: "M-cadherin localization in developing adult and regenerating mouse skeletal muscle: possible involvement in secondary myogenesis". *Mech. Dev.* 50:85-97 (1995).
- * CLOSE, R.I.: "Dynamic properties of mammalian skeletal muscles". *Physiol. Rev.* 52:129-197 (1972).
- * COERS, C. y DURAND, J.: "Données morphologiques nouvelles sur l'innervation des fuseaux neuromusculaires". *Arch. Biol.* 67:685-715 (1956).
- * COERS, C. y WOOLF, A.L.: "The innervation of muscle". Blackwell: Oxford (1959).
- * COGSWELL, A.M., STEVENS, R.J. y HOOD, D.A.: "Properties of skeletal muscle mitochondria isolated from subsarcolemmal and intermyofibrillar regions". *Am. J. Physiol.* 264:383-389 (1993).
- * COLLING-SALTIN, A.S.: "Skeletal muscle development in the human foetus and during childhood". En *Children and exercise IX*, pp 193-207. Ed. K. Berg y Eriksson. Baltimore (1980).
- * CONDON, K. y cols.: "Development of muscle fiber types in the prenatal rat hindlimb". *Dev. Biol.* 138:256-274 (1990).
- * COOKE, R.: "Actomyosin interaction in striated muscle". *Physiol. Rev.* 77: 671-697 (1997).
- * COOPER, S. y DANIEL, P.M.: "Human muscle spindles". *J. Physiol. (London)* 133:1-3 (1956).
- * CORVAJA, N., MARINOZZI, V. y POMPEIANO, O.: "Close appositions and junctions of plasma membranes of intrafusal muscle fibres in mammalian muscle spindles". *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 296:337-345 (1967).
- * CORVAJA, N., MARINOZZI, V. y POMPEIANO, O.: "Muscle spindles in the lumbrical muscle of the cat". *Arch. Ital. Biol.* 107:365-543 (1969).
- * COSSU, G. y cols.: "In vitro differentiation of satellite cells isolated from normal and dystrophic mammalian muscle. A comparison with embryonic myogenic cells". *Cell Differ.* 9:357-368 (1980).
- * COSSU, G. y cols.: "TPA-induced inhibition of the expression of differentiative traits in cultured myotubes: dependance on protein synthesis". *Differentiation*. 21:62-65 (1982).
- * COSTILL, D.L. y cols.: "Adaptations in skeletal muscle following strength training". *J. Appl. Physiol.* 46:96-99 (1979).
- * COUTEAUX, R.: "Localization of cholinesterases at neuromuscular junctions". *Intern. Rev. Cytol.* 4:335-375 (1955).
- * COUTEAUX, R. y NACHMANSOHN, D.: "Cholinesterase at the end-plates of voluntary muscles after nerve degeneration". *Nature* 142:1481 (1938).
- * COUTEAUX, R. y TAXI, J.: "Recherches histochemiques sur la distribution des activités cholinestérasiques au niveau de la synapse myoneurale". *Arch. d'Anat. Microscop. et Morphol. Exptl.* 41:352-392 (1952).
- * CULL-CANDY, S.G. y cols.: "Visualization of satellite cells in living muscle fibres of the frog". *Proc. R. Soc. London B.* 209:563-568 (1980).
- * CUMMINS, P. y PERRY, S.V.: "Chemical and immunochemical characteristics of tropomyosins from striated and smooth muscle". *Biochem. J.* 141:43-49 (1974).

- * DANIELI-BETTO, D., ZERBATO, E. y BETTO, R.: "Type 1, 2A and 2B myosin heavy chain electrophoretic analysis of rat muscle fibers". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138:981-987 (1986).
- * DAVID, J.D. y HIGGINBOTHAM, C.A.: "Fusion of chick embryo myoblasts: interactions of prostaglandin E1, adenosine 3':5' monophosphate and calcium influx". *Dev. Biol.* 82:308-316 (1981).
- * DAVIS, A.K. y CARLSON, S.S.: "Proteoglycans are present in the transverse tubule system of skeletal muscle". *Matrix Biol.* 14:607-621 (1995).
- * DE ROBERTIS, E.: "Submicroscopic morphology and function of the synapse". *Exptl. Cell Res. Suppl.* 5:347-369 (1958).
- * DECARY, S. y cols.: "Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy". *Hum. Gene Ther.* 8:1429-1438 (1997).
- * DELL'ORBO, C. y cols.: "The role of proteoglycans in maintaining collagen fibril morphology". *Histol. Histopathol.* 10:583-588 (1995).
- * DENNIS, M.J.; ZISKIND-CONHAIM, L. y HARRIS, A.J.: "Development of neuromuscular junction in rat embryos" *Dev. Biol.* 81:266-279 (1981).
- * DENNY-BROWN, D.: "The histological features of striped muscle in relation to its functional activity". *Proc. Roy. Soc. B* 104:371 (1929).
- * DESAKI, J. y UEHARA, Y.: "The overall morphology of neuromuscular junctions as revealed by scanning electron microscopy". *J. Neurocytol.* 10:101-110 (1981).
- * DEVOTO, S.H. y cols.: "Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo prior to somite formation". *Development* 122:3371-3380 (1996).
- * DIETERT, S.E.: "The demonstration of different types of muscle fibres in human extraocular muscle by electron microscopy and cholinesterase staining". *Invest. Ophthalmol.* 4:51-63 (1965).
- * DILIBERTY, J.H., D'AGOSTINO, A.N. y COLE, G.: "Needle muscle biopsy in infants and children". *J. Pediatr.* 103:566-570 (1983).
- * DOYERE, L.: "Mémoire sur les tardigrades". *Ann. Sci. Nat.* 14:269-361 (1840).
- * DRACHMAN, D.B. y JOHNSTON, D.M.: "Development of mammalian fast muscle: dynamic and biochemical properties correlated". *J. Physiol. Lond.* 234:29-42 (1973).
- * DREWS, G.A. y ENGEL, W.K.: "An attempt at histochemical localization of myoglobin in skeletal muscle by the benzidine-peroxidase reaction". *J. Histochem. Cytochem.* 9:206-207 (1961).
- * DUANCE, V.C. y cols.: "A role for collagen in the pathogenesis of muscular dystrophy?". *Nature (London)* 284:470 (1980b).
- * DUBOWITZ, V.: "Contribution of histochemistry to diagnosis of muscle pathology". *Isr. J. Med. Sci.* 13:126-130 (1977).
- * DUBOWITZ, V. y BROOKE, M.H.: "Muscle biopsy: A modern approach, 1st edn. London, Philadelphia and Toronto: W.B. Saunders. (1973).
- * DUBOWITZ, V. y PEARSE, A.G.E.: "Reciprocal relationship of phosphorylase and oxidative enzymes skeletal muscle". *Nature (London)*. 185:701 (1960a).
- * DUBOWITZ, V. y PEARSE, A.G.E.: "A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle". *Histochemie.* 2:105 (1960b).
- * DULHUNTY, A., GAGE, P. y VALOIS, A.: "Indentations in the terminal cisternae of slow- and fast-twitch muscle fibers from normal and paraplegic rats". *J. Ultrastruct. Res.* 84:50-59 (1983).
- * DULHUNTY, A.F., BANYARD, M.R. y MEDVECZKY, J.L.: "Distribution of calcium ATPase in the sarcoplasmic reticulum of fast and slow-twitch muscles determined with monoclonal antibodies". *J. Membr. Biol.* 99:79-92 (1987).
- * DULHUNTY, A.F. y VALOIS, A.A.: "Indentations in the terminal cisternae of

- amphibian and mammalian skeletal muscle fibres". *J. Ultrastruct. Res.* 84:34-49 (1983).
- * DUNN, M.J. y cols.: "Studies on the extracellular matrix in diseased human muscle". In *Matrices and cell differentiation*, Ed. Kemp, R.B. y Hinchcliffe, J.R., pp. 213-231. N.Y.: Alan R. Liss. (1984).
- * DÜSTERHOFT, S. y PETTE, D.: "Satellite cells from slow rat muscle express slow myosin under appropriate culture conditions". *Differentiation* 53:25-33 (1993).
- * DUXSON, M.J., USSON, Y. y HARRIS, A.J.: "The origin of secondary myotubes in mammalian skeletal muscles: ultrastructural studies". *Development* 107:743-750 (1989).
- * ECCLES, J.C., ECCLES, R.M. y KOZAK, W.: "Further investigations on the influence of motoneurons on the speed of muscle contraction". *J. Physiol. London* 163:324-339 (1962).
- * EDGERTON, V.R., ESSÉN, B. y CARROW, R.: "Histochemical changes in rat skeletal muscle after exercise". *Exp. Neurol.* 24:110-123 (1969).
- * EDMAN, K.A.: "The velocity of unloaded shortening and its relation to sarcomere length and isometric force in vertebrate muscle fibres". *J. Physiol. London* 291:143-159 (1979).
- * EDMON, F.V. y cols.: "Clones of human satellite cells can express in vitro both fast and slow myosin heavy chains". *Dev. Biol.* 164: 219-229 (1994).
- * EDSTRÖM, L. y EKBLOM, B.: "Differences in size of red and white muscle fibres in vastus lateralis of musculus quadriceps femoris of normal individuals and athletes. Relation to physical performance". *Scand.J. Clin. Lab. Invest.* 30:175-181 (1972).
- * EDSTRÖM, L. y EKBLOM, B.: "Differences in sizes of red and white muscle fibres in vastus lateralis of musculus quadriceps femoris of normal individuals and athletes. Relation to physical performance". *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 30:175-181 (1972).
- * EDSTRÖM, L., THORNELL, L.E. y ERIKSSON, L.: "A new type of hereditary distal myopathy with characteristic sarcoplasmic bodies and intermediate (skeletal) filaments". *J. Neurol. Sc.* 47:171 (1980).
- * EDWARDS, R.H.T. y cols.: "Percutaneous needle-biopsy in the diagnosis of muscle diseases". *Lancet* ii:1070-1071 (1973).
- * EDWARDS, R.H.T., YOUNG, A. y WILES, M.: "Needle biopsy of skeletal muscle in diagnosis of myopathy and clinical study of muscle function and repair". *N. Engl. J. Med.* 302:261-271 (1980).
- * EHMER, S. y cols.: "Spatial distribution of beta-spectrin in normal and dystrophic human skeletal muscle". *Acta Neuropathol. Berl.* 94:240-246 (1997).
- * EISEMBERG, E. y KIELLEY, W.W.: "Evidence for a refractory state of heavy meromyosin and subfragment-1 unable to bind to actin in the presence of ATP". *Cold Spring Harbor Symp. Biol.* 37:145-152 (1972).
- * EISEN, A. y cols.: "The motor unit profile of the rat soleus in experimental myopathy and reinnervation". *Neurology* 24:878-884 (1974).
- * EISENBERG, D.R. y KUDA, A.M.: "Discrimination between fibre populations in mammalian skeletal muscle by using ultrastructural parameters". *J. Ultrastruct. Res.* 54:76 (1976).
- * EISENBERG, D.R. y KUDA, A.M.: "Stereological analysis of mammalian skeletal muscle. I. Soleus muscle of the adult guinea pig". *J. Cell Biol.* 60:732 (1974).
- * EISENBERG, D.R. y KUDA, A.M.: "Stereological analysis of mammalian skeletal muscle. II. White vastus muscle of the adult guinea pig". *J. Ultrastruct. Res.* 51:176 (1975).
- * ELDRIGE, L. y MOMMAERTS, W.: "Ability of electrically silent nerves to specify fast and slow muscle characteristics". In: *Plasticity of Muscle*, ed. Pette. N.Y.: de Gruyter, p. 325-338 (1980).
- * ELLIOTT, A. y OFFER, G.: "Shape and flexibility of the myosin molecule". *J. Mol. Biol.* 123:505-509 (1978).
- * EMONET-DENAND, F., JOFFROY, M. y LAPORTE, Y.: "Absence d'axones exclusivement

fusimeteur dans les muscles pré-tibiaux du chat". J. Physiol. 63:46 (1971).

* EMONET-DENAND, F., JOFFROY, M. y LAPORTE, Y.: "Fibres fusimotrices dont l'action sur la sensibilité phasique des terminaisons primaires dépend de leur fréquence de stimulation". C.R. Acad. Sci. 275: 89-91 (1972).

* ENDO, M.: "Calcium release from the sarcoplasmic reticulum". Physiol. Rev. 57:71-108 (1977).

* ENESCO, M. y PUDDY, D.: "Increase in the number of nuclei and weight in skeletal muscle of the rats of various ages". Am. J. Anat. 114:235-244 (1964).

* ENGEL, W.K.: "The essentiality of histo-and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease". Neurology. 12:778 (1962).

* EPSTEIN, H.F. y FISCHMAN, D.A.: "Molecular analysis of protein assembly in muscle development". Science Wash. DC 251:1039-1044 (1991).

* ERIKSSON, E. y MYRHAGE, R.: "Microvascular dimensions and blood flow in skeletal muscle". Act. Physiol. Scand. 86:211-222 (1972).

* ESSÉN, B. y HENRICKSON, J.: "Glycogen content of individual muscle fibres in man". Acta Physiol. Scand. 90:645-647 (1974).

* ESSER, K., GUNNING, P. y HARDEMAN, E.: "Nerve-dependent and -independent patterns of mRNA expression in regenerating skeletal muscle". Dev. Biol. 159:173-183 (1993).

* FAULKNER, J.A. y cols.: "Adaptation of guinea pig plantaris muscle fibers to endurance training". Am. J. Physiol. 221:291-297 (1971).

* FAZARINC, G. y cols.: "Combined histochemical and immunohistochemical determination of three muscle fibre types in a single section of porcine skeletal muscle". Eur. J. Histochem. 39:309-316 (1995).

* FERRETTI, G. y COLS.: "The interplay of central and peripheral factors in limiting maximal

O₂ consumption in man after prolonged bed rest". J. Physiol. Lond. 501:677-686 (1997).

* FIEHN, W. y PETER, J.B.: "Properties of fragmented sarcoplasmic reticulum from fast twitch and slow twitch muscles". J. Clin. Invest. 50:570-573 (1971).

* FITTS, R.H. y HOLLOSZY, J.O.: "Contractile properties of rat soleus muscle: effects of training and fatigue". Am. J. Physiol. 233:86-91 (1977).

* FLEAR, C.T.G., CRAMPTON, R.F. y MATTHEWS, D.M.: "An in vitro method for the determination of the inulin space of skeletal muscle with observations on the composition of human muscle". Clin. Sci. 19:483-493 (1960).

* FLECKMAN, P., BAILYN, R.S. y KAUFMAN, S.: "Effects of the inhibition of DNA synthesis on hypertrophying skeletal muscle". J. Biol. Chem. 253:3320-3327 (1978).

* FLUCHER, B.E., TAKEKURA, H. y FRANZINI-ARMSTRONG, C.: "Development of the excitation-contraction coupling apparatus in skeletal muscle: association of sarcoplasmic reticulum and transverse tubules with myofibrils". Dev. Biol. 160:135-147 (1993).

* FOWLER, V.M. y cols.: "Tropomodulin is associated with the free (pointed) ends of the thin filaments in rat skeletal muscle". J. Cell Biol. 120:411-420 (1993).

* FRANCIS, R.: "Gomori rapid one step trichrome". En Manual of histological techniques and their diagnostic application. Ed. Churchill Livingstone. London. pp. 43-44 (1994).

* FRANKE, W.W.: "Nuclear lamins and cytoplasmic intermediate filament proteins: A growing multigene family". Cell 48:3-4 (1987).

* FRANZINI-ARMSTRONG, C.: "Studies of the triad. II. Penetration of tracers into the junctional gap". J. Cell Biol. 49:196 (1971).

* FREMONT, P.H., FOURNIER LE RAY, C. y LE DOUARIN, G.H.: "In vitro differentiation in the absence of nerve and avian myoblasts derived from slow and fast muscle rudiments". Cell Different. 13:325-339 (1983).

- * FRYER, M.W. y NEERING, I.R.: "Relationship between intracellular calcium concentration and relaxation of rat fast and slow muscles". *Neuroscience Letters* 64:231-235 (1986).
- * FUGLEVAND, A.J. y SEGAL, S.S.: "Simulation of motor unit recruitment and microvascular unit perfusion: spatial considerations". *J. Appl. Physiol.* 83:1223-1234 (1997).
- * FÜRST, D.O. y cols.: "The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line". *J. Cell Biol.* 106:1563-1572 (1988).
- * FÜRST, D.O., VINKEMEIER, U. y WEBER, K.: "Mammalian skeletal muscle C-protein: purification from bovine muscle, binding to titin and the characterization of a full-length human cDNA". *J. Cell Sci.* 102:769-778 (1992).
- * GALVAS, P.E., NEAVES, W.B. y GONYEA, W.J.: "Direct correlation of histochemical profile to the ultrastructure of single myofibers at their neuromuscular junction from a mixed muscle". *Anat. Rec.* 203:1-17 (1982).
- * GARAMVÖLGYI, N.: "Slow and fast muscle cells in human striated muscle". *Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung.* 7:165-169 (1972).
- * GARNETT, R.A.F. y cols.: "Motor unit organization of human medial gastrocnemius". *J. Physiol. London* 287:33-43 (1978).
- * GAUTHIER, G.F.: "On the relationship of ultrastructural and cytochemical features to color in mammalian skeletal muscle". *Z. Zellf. Mikrosk. Anat.* 95:462-482 (1969).
- * GAUTHIER, G.F.: "The ultrastructure of three fiber types in mammalian skeletal muscle". In: *The Physiology and Biochemistry of muscle as a food*. Vol.2, ed. Briskey, E., Cassens, R.G. and Marsh, B.B. Madison, Milwaukee and London: University of Wisconsin Press. (1970).
- * GAUTHIER, G.F.: In "Physiol and Biochem. of Muscle as Food, II" (Briskey, E.J., Cassens, R.G. and Marsh, B.B., Eds.), pp. 103-130, University of Wisconsin Press, Madison, (1970).
- * GAUTHIER, G.F. y LOWEY, S.: "Distribution of myosin isoenzymes among skeletal fiber types". *J. Cell Biol.* 81:12-25 (1979).
- * GELBER, D., MOORE, D.H. y RUSKA, H.: "Observations of the myo-tendon junction in mammalian skeletal muscle". *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 52:396-400 (1960).
- * GEORGE, J.C. y SCARIA, K.S.: "A histochemical study of dehydrogenase activity in the pectoralis major muscle of the pigeon and certain other vertebrate skeletal muscles". *Quart. J. Microscop. Science.* 99:469 (1958).
- * GEORGE-WEINSTEIN, M. y cols.: "In vitro and in vivo expression of $\alpha 7$ integrin and desmin define the primary and secondary myogenic lineages". *Dev. Biol.* 156:209-229 (1993).
- * GIBALA, M.J. y COLS.: "Changes in human ultrastructure and force production after acute resistance exercise". *J. Appl. Physiol.* 78:702-708 (1995).
- * GIBSON, M.C. y SCHULTZ, E.: "The distribution of satellite cells and their relationship to specific fiber types in soleus and extensor digitorum longus muscles". *Anat. Rec.* 202:329-337 (1982).
- * GIBSON, M.C. y SCHULTZ, E.: "Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells". *Muscle Nerve.* 6:574-580 (1983).
- * GLENMARK, B.: "Skeletal muscle fibre types, physical performance, physical activity and attitude to physical activity in women and men. A follow-up from age 16 to 27". *Acta Physiol. Scand.* 623:1-47 (1994).
- * GOLDEWSKI, H.G.: "Are active and inactive phosphorylase histochemically distinguishable?". *J. Histochem. Cytochem.* 11: 108-112 (1963).
- * GOLDSPIK, G.: "The combined effects of exercise and reduced food intake on skeletal muscle fibers". *J. Cell. Comp. Physiol.* 63:209-216 (1964).
- * GOLDSPIK, G.: "Sarcomere length during the post-natal growth of mammalian muscle fibre". *J. Cell. Sci.* 3:539-548 (1968).

- * GOLDSPIK, G., LARSON, R.G. y DAVIES, R.E.: "Thermodynamic efficiency and physiological characteristics of the chick anterior latissimus dorsi muscle". *Z. Vgl. physiol.* 66:379-388 (1970).
- * GOLLNICK, P.D. y cols.: "Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men". *J. Appl. Physiol.* 33: 312-319 (1972).
- * GOLLNICK, P.D., HERMANSEN, L. y SALTIN, B.: "The muscle biopsy: Still a research tool". *Phys. Sports Med.* 8:50-65 (1980).
- * GOMORI, G.: "Silver impregnation of of reticulum in paraffin section". *Am. J. Path.* 13: 993 (1937).
- * GORDON, A.M., HUXLEY, A.F. y JULIAN, F.J.: "The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres". *J. Physiol. London* 184:143-169 (1966).
- * GORDON, H. y VAN ESSEN, D.C.: "Specific innervation of muscle fiber types in a developmentally polyinnervated muscle". *Dev. Biol.* 111:42-50 (1985).
- * GORZA, L.: "Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies". *J. Histochem. Cytochem.* 38: 257-265 (1990).
- * GRABAREK, Z., TAO, T. y GERGELY, J.: "Molecular mechanisms of troponin-C function". *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 13:383-393 (1992).
- * GRANIT, R.: "Muscular afferents and motor control". Nobel Symposium I. New York: J. Wiley (1966).
- * GRANT, R.T. y PAYLING-WRIGHT, H.: "Further observations on the blood vessels of skeletal muscle". *J. Anat.* 103:553-565 (1968).
- * GRAY, S.D. y RENKIN, E.M.: "Microvascular supply in relation to fiber metabolic types in mixed skeletal muscles of rabbits". *Microvasc. Res.* 16:404-425 (1978).
- * GREASER, M.L. y GERGELY, J.: "Purification and properties of the components from troponin". *J. Biol. Chem.* 248:2125-2133 (1973).
- * GREEN, H.J.: "Glycogen depletion patterns during continuous and intermittent ice skating". *Med. Sci. Sports* 10:183-198 (1978).
- * GREEN, H.J. y cols.: "Exercise-induced fibre type transitions with regard to myosin, parvalbumin and sarcoplasmic reticulum in muscles of the rat". *Pflügers Arch.* 400:432-438 (1984).
- * GREEN, H.J. y cols.: "Fibre type specific glycogen utilization in rat diaphragm during treadmill exercise". *J. Appl. Physiol.* 63:75-83 (1987).
- * GREEN, H.J., REICHMAN, H. y PETTE, D.: "Fibre type specific transformations in the enzyme activity pattern of rat vastus lateralis muscle by prolonged training". *Pflügers Arch.* 399:216-222 (1983).
- * GRUNER, J.E.: "La structure fine du fuseau neuromusculaire humain". *Rev. Neurol.* 104:490-507 (1961).
- * GRÜTZNER, P.: "Zur Anatomie und Physiologie der quergestreiften Muskeln". *Rec. Zool. Suisse.* 1:665 (1884).
- * GULATI, J. y PODOLSKY, R.J.: "Isotonic contraction of skinned muscle fibers on a slow time base. Effects of ionic strength and calcium". *J. Gen. Physiol.* 78:233-257 (1981).
- * GUO, W., JORGENSEN, A.O. y CAMPBELL, K.P.: "Characterization and ultrastructural localization of a novel 90-kDa protein unique to skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum". *J. Biol. Chem.* 269:28359-28365 (1994).
- * GUTH, L. y SAMAHA, F.J.: "Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle". *Exp. Neurol.* 25:138-152 (1969).
- * GUTMANN, E. y HANZLIKOVÁ, V.: "Age changes in neuromuscular system". Sciencetechnica (publ.) Ltd., Bristol. (1972).

- * HÄGGMARK, T. y THORSTENSSON, A.: "Fibre types in abdominal muscles". *Acta Physiol. Scand.* 107:319-325 (1979).
- * HAILSTONE, D.L. y GUNNING, P.W.: "Characterization of human myosin light chains 1sa and 3nm: implications for isoform evolution and function". *Mol. Cell Biol.* 10:1095-1104 (1990).
- * HÄKKINEN, K. y COLS.: "Neuromuscular adaptations and serum hormones in females during prolonged power training". *Int. J.Sports Med.* 11:91-98 (1990).
- * HALL, S.M. y ENVER, K.: "Axonal regeneration through heat pretreated muscle autografts. An immunohistochemical and electron microscopic study". *J. Hand Surg. Br.* 19:444-451 (1994).
- * HAMOSH, M. y cols.: "Enhanced protein synthesis in a cell-free system from hypertrophied skeletal muscle". *Science* 157:935-937 (1967).
- * HANAK, H. y BÖCK, P.: "Die feinstruktur der Muskel-séhnenverbindung von Skelett-und Herzmuskel". *J. Ultrastruct. Res.* 36:68-75 (1971).
- * HANSON, J. y LOWY, J.: "The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle". *J. Molec. Biol.* 6:46 (1963).
- * HÄRKÖNEN, M. y cols.: "High-energy phosphate compounds in human slow-twitch muscle fibers: methodological and functional aspects". *Muscle Nerve* 3:264 (1980).
- * HARRI, M.N.E.: "Effect of prolonged beta-blockade on energy metabolism and adrenergic responses in the rat". *Med. Biol.* 55:268-276 (1977).
- * HASSELBACH, W.: "Elektromikroskopische untersuchungen an muskelfibrillen bei totaler und partieller estraktion des L-myosins". *Ztschr. Naturforsch.* 86:449 (1953).
- * HATHER, B.M. y COLS.: "Influence of eccentric actions on skeletal muscle adaptations to resistance training". *Acta Physiol. Scand.* 143:177-185 (1991).
- * HEIDENHAIN, M.: "Noch einmal über die Darstellung der Centrankörper durch Eisen-hämatoxylin nebst einigen allgemeinen Bamerkunden über die Hämatoxylin-färben". *Z. Wiss. Mikr.* 13: 186-199 (1896).
- * HEIDENHEIN, M.: "Über die Entstehung der quergestreiften Muskelsubstanz". *Arch. Mikroskop. Anat. Entwick.* 83:427-653 (1913).
- * HEISTRACHER, P. y HUNT, C.C.: "The relation of membrane changes to contraction in twitch muscle fibres". *J. Physiol.* 201:589-611 (1969).
- * HELANDER, E.A.S.: "Influence of exercise and restricted activity on the protein composition of skeletal muscle". *Biochem. J.* 78:478-482 (1961).
- * HENDERSON, D.W., GOLL, D.E. y STROMER, M.E.: "A comparison of shortening and Z-line degradation in post-mortem bovine, porcine, and rabbit muscle". *Am. J. Anat.* 128:117-136 (1970).
- * HENNERMAN, E. y OLSON, C.: "Relations between the structure and function in the design of skeletal muscles". *J. Neurophysiol.* 28:581-598 (1965).
- * HENNERMAN, E., SOMJEN, G. y CARPENTER, D.O.: "Excitability and inhibitability of motoneurons of different sizes". *J. Neurophysiol.* 28:599-620 (1965).
- * HEPPLER, R.T.: "A new measurement of tissue capillarity: the capillary-to-fibre perimeter exchange index". *Can. J. Appl. Physiol.* 22:11-22 (1997).
- * HEPPLER, R.T. y COLS.: "Resistance and aerobic training in older men: effects on VO₂ peak and the capillary supply to skeletal muscle". *J. Appl. Physiol.* 82:1305-1310 (1997).
- * HERMANSEN, L., HULTMAN, E. y SALTIN, B.: "Muscle glycogen during prolonged severe exercise". *Acta. Physiol. Scand.* 71:129-139 (1967).
- * HESS, A. y ROSNER, S.: "The satellite cell bud and myoblast in denervated mammalian muscle fibers". *Am. J. Anat.* 129:21-40 (1970).
- * HEUSER, J.E. y SALPETER, S.R.: "Organization of acetylcholine receptors in quickfrozen, deep-etched, and rotary-replicated

- torpedo postsynaptic membrane*". *J. Cell Biol.* 82:150-173 (1979).
- * HICKSON, R.C. y cols.: "Skeletal muscle enzyme alterations after sprint and endurance training". *J. Appl. Physiol.* 40:868-872 (1975).
- * HIGASHI-FUJIME, S.: "In vitro movements of actin and myosin filaments from muscle". *Cell Mot. Cytoskeleton* 6:159-162 (1986).
- * HILFER, S.R., SEARLS, R.L. y FONTE, V.G.: "An ultrastructural study of early myogenesis in the chick wing bud". *Dev. Biol.* 30:374-391 (1973).
- * HILL, A.V.: "First and last experiments in muscle mechanics". Cambridge Univ. Press: Cambridge (1970).
- * HILL, A.V.: "The maximum work and mechanical efficiency of human muscles and their most economical speed". *J. Physiol London* 56:19-41 (1922).
- * HILL, A.V., y HARTREE, W.: "The four phases of head production of muscle". *J. Physiol. London* 54:84-128 (1920).
- * HILL, D.K.: "The space accesible to albumin within the striated muscle fibers of the toad". *J. Physiol.(London)* 175:275 (1964).
- * HINTZ, C.S. y cols.: "Enzyme levels in individual rat muscle fibers". *Am. J. Physiol.* 239:C58-65 (1980).
- * HOH, J.F.Y.: "Neural regulation of mammalian fast and slow muscle myosins: an electrophoretic analysis". *Biochemistry* 14:742-747 (1975).
- * HOH, J.F.Y., McGRATH, P.A. y HALE, P.T.: "Electrophoretic analysis of multiple forms of cardiac myosin: effect of hypophysectomy and thyroxine replacement". *J. Mol. Cell Cardiol.* 10:1053-1076 (1978).
- * HOLLEY, J.A. y FAHIM, M.A.: "Scanning electron microscopy of mouse muscle microvasculature". *Anat. Rec.* 205:109-117 (1983).
- * HOLLY, R.G. y cols.: "Stretch-induced growth in chicken wing muscle: a new model of stretch hypertrophy". *Am. J. Physiol.* 238:C62-C71 (1980).
- * HOPPELER, H., HUDLICKÁ, O. y UHLMANN, E.: "The relationship between capillary density, volume density of mitochondria and maximal blood flow in various cat muscles". *J. Physiol.* 342:1-32 (1983).
- * HOPPELER, H. y cols.: "Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle". *J. Appl. Physiol.* 59:320-327 (1985).
- * HORTOBAGY, T y cols.: "The effects of detraining on power athletes". *Med. Sci. Sports Exerc.* 25:929-935 (1993).
- * HOTCHKISS, R.D.: "A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations". *Arch. Biochem.* 16: 131-141 (1948).
- * HOUSTON, M.E.: "The use of histochemistry in muscle adaptation: a critical assessment". *Can. J. Appl. Sport Sc.* 3:109-118 (1978).
- * HOWALD, H. y COLS.: "Influences of endurance training on the ultrastuctural composition of the different muscle fiber types in humans". *Pflügers Arch.* 403:369-376 (1985).
- * HUBBARD, R.W. y cols.: "Compensatory adaptation of skeletal muscle composition to a long-term functional overload". *Growth* 39:85-93 (1985).
- * HUDLICKÁ, O.: "Muscle blood flow. Its relation to muscle metabolism and function". Amsterdam: Swez y Zeitlinger, (1973).
- * HUDLICKÁ, O.: "Effect of training on macro- and microcirculatory changes in exercise". *Exercise Sport Sci. Rev.* 6:181-230 (1980).
- * HUDLICKÁ, O.: "Development of microcirculation: capillary growth and adaptation". En *Handbook of Physiology-The cardiovascular system. vol IV. pp 165-215. Ed. Renkin y Michel. Maryland (1984).*
- * HURSH, J.B.: "Conduction velocity and diameter of nerve fibers". *Am. J. Physiol.* 127:131-139 (1939).

- * HULTMAN, E.: "Muscle glycogen in man determined in needle biopsy specimens: method and normal values". *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 19:209-217 (1967).
- * HUXLEY, A.F.: "Muscle structure and theories of contraction". *Prog. Biophys. Biophys. Chem.* 7:255-318 (1957).
- * HUXLEY, A.: "Muscular contraction". *Ann. Rev. Physiol.* 50:1-16 (1988).
- * HUXLEY, A.F. y NIEDERGERKE, R.: "Structural changes in muscle during contraction". *Nature. London.* 173:971-973 (1954).
- * HUXLEY, A.F. y PEACHEY, L.D.: "The maximum length for contraction in vertebrate striated muscle". *J. Physiol. London* 156:150-165 (1961).
- * HUXLEY, H.E.: "The double array of filaments in cross-striated muscle". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3:631 (1957).
- * HUXLEY, H.E.: "Electron microscope studies of natural and synthetic protein filaments from striated muscle". *J. Molec. Biol.* 7:281-308 (1963).
- * HUXLEY, H.E.: "The fine structure of striated muscle and its functional significance". *Harvey Lect.* 60:85 (1965).
- * HUXLEY, H.E.: "The mechanism of muscular contraction". *Science* 164:1356 (1969).
- * HUXLEY, H.E. y BROWN, W.: "The low-angle X-ray diagram of vertebrate striated muscle and its behaviour during contraction and rigor". *J. Molec. Biol.* 30:383 (1967).
- * HUXLEY, H.E. y HANSON, J.: "Changes in the cross striations of muscle during contractions and stretch and their interpretation". *Nature. London.* 173:973-976 (1954).
- * IGLESIAS, M. y cols.: "S-laminin and N-acetylgalactosamine located at the synaptic basal lamina of skeletal muscle are involved in synaptic recognition by growing neurites". *J. Neurocytol.* 24:903-915 (1995).
- * IKAI, M. y FUKUNAGA, T.: "A study of training effects on strength per unit cross-sectional area of muscle by means of ultrasonic measurement". *Int. Z. Angew. Physiol.* 28:173-180 (1970).
- * ILLG, D. y PETTE, D.: "Turnover rates of hexokinase I, phosphofructokinase, pyruvate kinase, and creatinine kinase in slow-twitch soleus muscle and heart of the rabbit". *Eur. J. Biochem.* 97:267-273 (1979).
- * INGJER, F.: "Maximal aerobic power related to the capillary supply of the quadriceps femoris muscle in man". *Acta Physiol. Scand.* 104:238-240 (1978).
- * INGJER, F.: "Effects of endurance training on muscle fibre ATPase activity, capillary supply and mitochondrial content in man." *J. Physiol.* 294:419-432 (1979a).
- * INGJER, F.: "Capillary supply and mitochondrial content of different skeletal muscle fiber types in untrained and endurance trained men". *Eur. J. Appl. Physiol.* 40:197-209 (1979b).
- * ISHIKAWA, H.: "The fine structure of myotendon junction in some mammalian skeletal muscles". *Arch. Histol. Jpn.* 25:275-296 (1965).
- * ISHIMOTO, S. y cols.: "A quantitative study of the muscle satellite cells in various neuromuscular disorders". *J. Neurol. Sci.* 62:303-314 (1983).
- * IWAOKA, K. y cols.: "Characteristics of the leg extensor muscle in a world champion masters jumper". *Sports Med Phys Fitness.* 29:394-397 (1989).
- * JANSSON, E. y KAIJSER, L.: "Muscle adaptation to extreme endurance training in man". *Acta Physiol. Scand.* 100:315-324 (1977).
- * JANSSON, E. y SYLVEN, C.: "Myoglobin concentration in single type I and type II muscle fibres in man". *Histochem.* 78:121-124 (1983).
- * JENNEKENS, F.G.I., TOMLINSON, B.E. y WALTON, J.L.: "Data on the distribution of the fibre type in five human limb muscles". *J. Neurol. Sci.* 14:245-257 (1971).
- * JONES, P.H.: "In vitro comparison of embryonic myoblasts and myogenic cells isolated from

- regenerating adult rat skeletal muscle". *Exp. Cell Res.* 139:401-404 (1982).
- * JUBRIAS, S.A. y cols.: "Decline in isokinetic force with age: muscle cross-sectional area specific force". *Pflugers Arch.* 434:246-253 (1997).
- * KALLMAN, J.: "Aldehyde fuchsin-toluidine blue". *Stain Tech.* 46: 210 (1971).
- * KAMEDA, N. y COLS.: "Developmental studies of the expression of myosin heavy chain isoforms in culture human muscle aneurally and innervated with fetal rat spinal cord". *J. Neurol. Sci.* 114:85-98 (1993).
- * KANG, S.J. y cols.: "Involvement of transglutaminase in myofibril assembly of chick embryonic myoblasts in culture". *J. Cell Biol.* 130:1127-1136 (1995).
- * KARLSSON, J. y cols.: "Muscle lactate, ATP, and CP levels during exercise after physical training in man". *J. Appl. Physiol.* 33:199-203 (1972).
- * KARLSSON, J. y cols.: "Distribution of LDH isozymes in human skeletal muscle". *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 33:307-312 (1974).
- * KARLSSON, J.; DIAMANT, B. y SALTIN, B.: "Muscle metabolites during submaximal and maximal exercise in man". *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 26:358-394 (1971).
- * KATZ, B.: "The terminations of the afferent nerve fibre in the muscle spindle of the frog". *Philos. Trans. R. Soc. London B.* 243:221-240 (1961).
- * KATZUNG, B.G.: "Basic and clinical pharmacology". Ed. East Norwalk, Appleton-Lange (1989).
- * KAYAR, S.R. y cols.: "Mitochondrial distribution in relation to changes in muscle metabolism in rat soleus". *Resp. Physiol.* 64:1-11 (1986).
- * KELLY, A.M.: "Satellite cells and myofiber growth in the rat soleus and extensor digitorum longus muscle". *Dev. Biol.* 65:1-10 (1978).
- * KELLY, A.M. y RUBINSTEIN, N.A.: "Patterns of myosin synthesis in regenerating normal and denervated muscles of the rat". In: *Plasticity of Muscle*, ed. Pette. N.Y.: de Gruyter, p. 161-175 (1980).
- * KELLY, R. y cols.: "Myosin light chain 3F regulatory sequences confer regionalized cardiac and skeletal muscle expression in transgenic mice". *J. Cell. Biol.* 129:383-396 (1995).
- * KENNEDY, W.R.: "Innervation of normal human muscle spindles". *Neurology* 20:463-475 (1970).
- * KIENS, B. y LITHELL, H.: "Lipoprotein metabolism influenced by training-induced changes in human skeletal muscle". *J. Clin. Invest* (1989).
- * KIRBY, R.L. y cols.: "Needle muscle biopsy: techniques to increase sample sizes, and complications". *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 63:264-268 (1982).
- * KJELDSEN, K.; NORGAARD, A. y HAU, C.: "Human skeletal muscle Na, K-ATPase concentration quantified by 3H-ouabain binding to intact biopsies before and after moderate physical conditioning". *Int. J. Sports Med.* 11:304-307 (1990).
- * KLITGAARD, H., ANSONI, S. Y DAMIANI, E.: "Sarcoplasmic reticulum of human skeletal muscle: age-related changes and effects of training". *Act. Physiol. Scand.* 137:23-31 (1989).
- * KLITGAARD, H. y CLAUSEN, T.: "Increased total concentration of Na-K pumps in vastus lateralis muscle of old trained human subjects". *J. Appl. Physiol.* 67:2491-2494 (1989).
- * KNAPPEIS, G.G. y CARLSEN, F.: "The ultrastructure of the Z disc in skeletal muscle". *J. Cell Biol.* 13:323-335 (1962).
- * KNAPPEIS, G.G. y CARLSEN, F.: "The ultrastructure of the M line in skeletal muscle". *J. Cell Biol.* 38:202-211 (1968).
- * KNOLL, P.: "Über protoplasmaarme und protoplasmareiche Muskulatur". *Denkschriften der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften (Mathematische Naturwissenschaftliche Class Wien)*. 58:663 (1891).

- * KOBAYASHI, N. y YONEMURA, Y.: "The extracellular space in red and white muscle of the rat". *Jpn. J. Physiol.* 17:698-707 (1967).
- * KÖLLIKER, A.: "Einige Bemerkungen über die Endigungen der Hautnerve und den Bau der Muskeln". *Z. Wiss. Zool.* 8:311 (1857).
- * KOMINZ, D.R. y cols.: "The papain digestion of skeletal myosin A.". *Biochemistry* 4:2373 (1965).
- * KONIGSBERG, U.R., LIPTON, B.H. y KONIGSBERG, I.R.: "The regenerative response of single mature muscle fibers isolated in vitro". *Dev. Biol.* 45:260-275 (1975).
- * KORNELIUSSEN, H. y WAERHAUG, O.: "Three morphological types of motor nerve terminals in the rat diaphragm, and their possible innervation of different muscle fiber types". *Z. Anat. Entw.-Gesch.* 140:73-84 (1973).
- * KOVANEN, V., SUOMINEN, H. y HEIKKINEN, E.: "Connective tissue of fast and slow skeletal muscle in rats-effects of endurance training". *Acta. Physiol. Scand.* 108:173-180 (1980).
- * KRSTIC, R.V.: "Los tejidos del hombre y los mamíferos". Ed. McGraw-Hill. Madrid (1989).
- * KUGELBERG, E. y LINDEGREN, B.: "Transmission and contraction fatigue of rat motor units in relation to succinate dehydrogenase activity of motor unit fibres". *J. Physiol. London* 288:285-300 (1979).
- * KÜHNE, W.: "Neue Untersuchungen über motorische Nervenendigungen". *Z. Biol.* 23:1-148 (1887).
- * KÜHNE, W.: "Über die endigung der nerven in den nervenhügeln der muskeln. *Virch. Arch. Path. Anat.* 30:187-220 (1864).
- * KUZON, W.M. y cols.: "Skeletal muscle fiber type, fiber size, and capillary supply in elite soccer players". *Int. J. Sports Med.* 11:99-102 (1990).
- * LABEIT, S. y KOLMERER, B.: "The complete primary structure of human nebullin and its correlation to muscle structure". *J. Mol. Biol.* 248:308-315 (1995).
- * LANDIN, S. y cols.: "Muscle metabolism during exercise in patients with Parkinson's disease". *Clin. Sc. Mol. Med.* 47:493-506 (1974).
- * LARSSON, L.: "Is the motor unit uniform?". *Acta Physiol. Scand.* 144:143-154 (1992).
- * LAYMAN, D.K., HEGARTY, P.V.J. y SWAN, P.B.: "Comparison of morphological and biochemical parameters of growth in rat skeletal muscle". *J. Anat.* 130:159-171 (1980).
- * LAZARIDES, E.: "Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space". *Nature (London)* 283:249-256 (1980).
- * LEE, F.S., GUENTHER, A.E. y MELENEY, H.E.: "Some of the general physiological properties of diaphragm muscle as compared with other mammalian muscles". *Am. J. Physiol.* 40:446 (1916).
- * LEHNINGER, A.L.: "Cell organelles: the mitochondrion". In "The Neurosciences". Ed. Quarten, G.C., Melnechuls, T. y Schmitt, F.O.. Rockefeller Univ. Press, N.Y. (1967).
- * LEXELL, J., HENRIKSSON-LARSEN, K. y SJÖSTRÖM, M.: "Distribution of different fibre types in human skeletal muscle. 2. A study of cross-sections of whole muscle vastus lateralis". *Acta Physiol. Scand.* 117:115-122 (1983).
- * LEXELL, J. y COLS.: "Heavy-resistance training in older Scandinavian men and women: short- and long-term effects on arm and leg muscles". *Scand. J. Med. Sci. Sports* 5:329-341 (1995).
- * LIGHT, N. y CHAMPION, A.E.: "Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens". *Biochem. J.* 219:1017-1026 (1984).
- * LING, G.N. y KROMASH, M.H.: "The extracellular space of voluntary muscle tissue". *J. Gen. Physiol.* 50:677-694 (1967).
- * LIPTON, B.H.: "Collagen synthesis by normal and bromideoxy uridine modulated cells in myogenic culture". *Dev. Biol.* 61:153-165 (1977).
- * LIPTON, B.H. y SCHULTZ, E.: "Developmental fate of skeletal muscle satellite cells". *Science.* 205:1292-1294 (1979).

- * LOMO, T. y WAERHAUG, O.: "Motor endplates in fast and slow muscles of the rat: What determines their differences?". *J. Physiol.* 80:290-297 (1985).
- * LOMPRÉ, A.M., NADL-GINARD, B. y MAHDAVI, V.: "Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain is developmentally and hormonally regulated". *J. Biol. Chem.* 259:6437-6446 (1984).
- * LÓPEZ DE REGO, J., VILLALÓN, J.M. y FLORES HERRÁEZ, R.: "Efectos del entrenamiento en el desarrollo de la fuerza muscular". *Selección* 1:27-34 (1989).
- * LOWEY, S. y cols.: "Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation". *J. Molec. Biol.* 42:1 (1969).
- * LOWRY, C.V. y cols.: "Enzyme pattern in single human muscle fibres". *J. Biol. Chem.* 253:8269-8277 (1978).
- * LOWRY, O.H. y cols.: "Enzymological heterogeneity of human muscle fibers". In: *Plasticity of Muscle*, editado por D. Pette. New York: de Gruyter, p.3-18 (1980).
- * LUFT, J.H.: "Improvements in epoxy resin embedding methods". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9:409-414 (1961).
- * LUNDE, P.K. y SEJERSTED, O.M.: "Intracellular calcium signalling in striated muscle cells". *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 57:559-568 (1997).
- * LUQUE, E. y cols.: "Capillary supply during development of individual regenerating muscle fibers". *Anat. Histol. Embryol.* 24:87-89 (1995).
- * LYMN, R.W. y TAYLOR, E.W.: "Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actyomycin". *Biochemistry* 10:4617-4624 (1971).
- * MACCHI, G.: "Potasio y trabajo muscular". *Sport Med.* 27:42-45 (1991).
- * MAGUIRE, P.B. y cols.: "Oligomerization is an intrinsic property of calsequestrin in normal and transformed skeletal muscle". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240:721-727 (1997).
- * MAGUIRE, P.B. y COLS.: "Oligomerization is an intrinsic property of colsequestrin in normal and transformed skeletal muscle". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240:721-727 (1997).
- * MARECHAL, G. y cols.: "Isozymes of myosin in growing and regenerating rat muscles". *Eur. J. Biochem.* 138:421-428 (1984).
- * MARGOSSIAN, S.S. y LOWY, S.: "Substructure of the myosin molecule. IV. Interactions of myosin and its subfragments with adenosine triphosphate and F-actin". *J. Mol. Biol.* 74:313-330 (1973).
- * MARTINELLI, M. y COLS.: "Muscle lipofuscin content and satellite cell volume is increased after high altitude exposure in humans". *Experientia* 46:672-676 (1990).
- * MARTONOSI, A.N. y BEELER, T.J.: "Mechanism of Ca^{2+} transport by sarcoplasmic reticulum". In "Skeletal muscle" pp.417-485 (*Handbook of Physiology*). Ed. Peachey, L.D., Adrian, R.H. y Geiger, S.R. Am. Physiol. Soc. Maryland (1983).
- * MASSON, P.: "Some histological methods. Trichrome stainings and their preliminary technique". *J. Tech. Meth. Bull. Int. Ass. Med. Museums* 12: 75 (1929).
- * MASTAGLIA, F.L., PAPADIMITRIOU, J.M. y KAKULAS, M.B.: "Regeneration of muscle in Duchenne muscular dystrophy: An electron microscope study". *J. Neurol. Sci.* 11:425-444 (1970).
- * MASTAGLIA, F.L. y KAKULAS, B.M.: "A histological and histochemical study of skeletal muscle regeneration in polymyositis". *J. Neurol. Sci.* 10:471-487 (1970).
- * MAURO, A.: "Satellite cell of skeletal muscle fibers". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9:493-498 (1961).
- * MAURO, A. y ADAMS, R.: "The structure of the sarcolemma of the frog skeletal muscle fiber". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 10:177 (Supplement) (1961).
- * MAZANET, R. y cols.: "Variability in the shapes of satellite cells in normal and injured frog sartorius muscle". *Dev. Biol.* 93:22-27 (1982).

- * MAZANET, R. y FRANZINI-ARMSTRONG, C.: "Scanning electron microscopy of pericytes in rat red muscle". *Microvasc. Res.* 23:361-369 (1982).
- * McCALL, G.E. y cols.: "Muscle fiber hypertrophy, hyperplasia, and capillary density in college men after resistance training". *J. Appl. Physiol.* 81:2004-2012 (1996).
- * McCALLUM, J.B.: "On the striated muscle and the growth of the human sartorius muscle". *Johns Hopkins Hops. Bull.* 9:208-215 (1898).
- * McCOMAS, A.J. y cols.: "Electrophysiological estimation of the number of motor units within human muscle". *J. Neurol. Neurosur. Psychiatry* 34:121-131 (1971).
- * McCOMAS, A.J. y THOMAS, H.C.: "Fast and slow twitch muscles in man". *J. Neurol. Sci.* 7: 301-307 (1968).
- * McDONALD, K.A., LAKONISHOK, M. y HORWITZ, A.F.: "Alpha v and alpha 3 integrin subunits are associated with myofibrils during myofibrillogenesis". *J. Cell Sci.* 108:2573-2581 (1995).
- * McDOUGALL, J.D. y cols.: "Biochemical adaptation of human skeletal muscle to heavy resistance training and immobilization". *J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 43:700-703 (1977).
- * McDOUGALL, J.D. y cols.: "Mitochondrial volume density in human skeletal muscle following heavy resistance training". *Med. Sci. Sports* 11:164-166 (1979).
- * McLENNAN, I.S. y KOISHI, K.: "Cellular localisation of transforming growth factor-beta 2 y -beta 3 in damage and regenerating skeletal muscle". *Dev. Dyn.* 208:278-289 (1997).
- * MCMAHAN, U.J., SPITZER, N.C. y PEPER, K.: "Visual identification of nerve terminals in living isolated skeletal muscle". *Proc. R. Soc. Lond. B.* 181:421-430 (1972).
- * McMANUS, J.F.A.: "Histological demonstration of mucin after periodic acid". *Nature* 158:202-203 (1946).
- * McMILLAN, A.S. y HANNAM, A.G.: "Motor-unit territory in the human masseter muscle". *Arch. Oral Biol.* 36:435-441 (1991).
- * MEECH, R.W. y STANDEN, N.B.: "Potassium activation in *Helix aspersa* neurones under voltage clamp: a component mediated by calcium influx". *J. Physiol.* 249:211-239 (1975).
- * MELLANDER, S.: "Differentiation of fiber composition, circulation, and metabolism in limb muscles of dog, cat, and man". In: *Mechanisms of Vasodilatation*, editado por P.M. Vanhoutte and I. Leusen. New York: Raven, p. 243-254 (1981).
- * MERO, A., JAAKKOLA, L. y KOMI, P.V.: "Relationships between muscle fibre characteristics and physical performance capacity in trained athletic boys". *J. Sports Sci.* 9:161-171 (1991).
- * MERRILLEES, N.C.R.: "Some observations on the fine structure of Golgi tendon organ of a rat". In: *Symposium on muscle receptors*. Barker, D. Ed. pp. 199-206. Hong Kong Univ. (1962).
- * MIDSUKAMI, M.: "The structure and distribution of satellite cells of cardiac muscles in decapod crustaceans". *Cell. Tiss. Res.* 219:69-83 (1981).
- * MILBURN, A.: "The early development of muscle spindles in the rat". *J. Cell. Sci.* 12:175-195 (1973).
- * MILWARD, D.J.: "Protein turnover in skeletal muscle and cardiac muscle during normal growth and hypertrophy". In: *Degradative processes in heart and skeletal muscle*, Wildenthal, K., Ed., Elsevier North-Holland Biomedical Press. pp. 161-199 (1980).
- * MIZUMO, M. y SECHER, N.H.: "Histochemical characteristics of human expiratory and inspiratory intercostal muscles". *J. Appl. Physiol.* 67:592-598 (1989).
- * MONDELLO, MR. Y cols.: "Immunolocalization of the costameres in human skeletal muscle fibers: confocal scanning laser microscope investigations". *Anat. Rec.* 245:481-487 (1996).
- * MOORE, D.H. y RUSKA, H.: "Electron microscope study of mammalian cardiac muscle cells". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3:261 (1957).

- * MOORE, L.A. y cols.: "Gene conversions within the skeletal myosin multigene family". *J. Mol. Biol.* 223:383-387 (1992).
- * MORGAN, T.E. y cols.: "Effects of long-term exercise on human muscle mitochondria". En: *Muscle metabolism during exercise*. pp. 87-95. Ed. Pernow y Saltin. New York (1971).
- * MORNET, D. y cols.: "Structure of the actin-myosin interface". *Nature London* 292:301-306 (1981).
- * MORPURGO, B.: "On the nature of functional hypertrophy of voluntary muscle". *Arch. Sc. Med.* 19:327-336 (1897).
- * MOSCOSO, L.M., MERLIE, J.P. y SANES, J.R.: "N-CAM, 43K-rapsyn, and S-laminin mRNAs are concentrated at synaptic sites in muscle fibers". *Mol. Cell Neurosci.* 6:80-89 (1995).
- * MOSS, F.P. y LEBLOND, C.P.: "Nature of dividing nuclei in skeletal muscle of growing rats". *J. Cel. Biol.* 44:459-462 (1970).
- * MOSS, F.P. y LEBLOND, C.P.: "Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats". *Anat. Rec.* 170:421-436 (1971).
- * MOSS, R.L.: "Ca regulation of mechanical properties of striated muscle. Mechanistic studies using extraction and replacement of regulatory proteins". *Circ. Res.* 70:865-884 (1992).
- * MUIR, A.R.: "Observations on the attachment of myofibrils to the sarcolemma at the muscle-tendon junction". In *Electron Microscopy in Anatomy*. J. D. Boyd, F. R. Johnson y J. D. Lever (Eds.). Arnold, London (1961).
- * MUIR, A.R.: "The structure and distribution of satellite cells". In: *Regeneration of striated muscle, and myogenesis*, Mauro A. et al., Eds, Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 91-100 (1970).
- * MUIR, A.R., KANJI, A.H.M. y ALLBROOK, D.B.: "The structure of the satellite cells in skeletal muscle". *J. Anat.* 99:435-444 (1965).
- * MUÑOZ, P. y cols.: "Isolation and characterization of distinct domains of sarcolemma and T-tubules from rat skeletal muscle". *Biochem. J.* 307:273-280 (1995).
- * MURATA, F. y OGATA, T.: "The ultrastructure of neuromuscular junction of human red, white and intermediate striated muscle fibers". *Tohoku J. Exp. Med.* 99:289-301 (1969).
- * MURRAY, M.A. y ROBBINS, N.: "Cell proliferation in denervated muscle: time course, distribution and relation to disuse". *Neuroscience.* 7:1817-1822 (1982a).
- * MURRAY, M.A. y ROBBINS, N.: "Cell proliferation in denervated muscle: identity and origin of dividing cells". *Neuroscience.* 7: 1823-1834 (1982b).
- * NABESHIMA, Y. y cols.: "Alternative transcription and two modes of splicing result in two myosin heavy chains from one gene". *Nature Lond.* 308:333-338 (1984).
- * NACHLAS, M.M., WALKER, D.G. y SELIGMAN, A.M.: "A histochemical method for the demonstration of diphosphopyridine nucleotide diaphorase". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4:29-38 (1958a).
- * NACHLAS, M.M., WALKER, D.G. y SELIGMAN, A.M.: "The histochemical localization of triphosphopyridine nucleotide diaphorase". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4:467-474 (1958b).
- * NACHMIAS, V.T. y PADYKULA, H.A.: "A histochemical study of normal and denervated red and white muscles of the rat". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4:47 (1958).
- * NAKAJIMA, Y. y ENDO, M.: "Release of calcium induced by depolarization of the sarcoplasmic reticulum membrane". *Nature London* 246:216-218 (1973).
- * NARICI, M.V. y COLS.: "Human quadriceps cross-sectional area, torque and neural activation during 6 months strength training". *Acta Physiol. Scand.* 157:175-186 (1996).
- * NEMETH, P. y PETTE, D.: "Succinate dehydrogenase activity in fibres classified by myosin ATPase in three hind limb muscles of rat". *J. Physiol.* 320:73-81 (1981).
- * NEMETH, P., PETTE, D. y VRBONVA, G.: "Comparison of enzyme activities among single

- muscle fibres within defined motor units. *J. Physiol.* 311:489-495 (1981).
- * NEUFER, P.D. y COLS.: "Continuous contractile activity induces fiber type specific expression of HSP70 in skeletal muscle". *Am. J. Physiol.* 271:1828-1837 (1996).
- * NYGAARD, E.: "Morfologi og funktion i m. Biceps brachii". Copenhagen: Univ. Of Copenhagen, Tesis. (1981).
- * NYGAARD, E.: "Skeletal muscle fibre characteristics in young women". *Acta Physiol. Scand.* 112:299-304 (1982).
- * NYGAARD, E. y NIELSEN, E.: "Skeletal muscle fiber capillarization with extreme endurance training in man". In: *Swimming Medicine IV*, editado por B. Eriksson y B. Furberg. Baltimore, MD: University Park, p.282-293, (1978).
- * ODA, T., SEKI, S. y OKAZAKI, H.: "New colorimetric methods for the estimation of cytochrome c oxidase and cytochrome c-cytochrome oxidase system". *Acta Med. Okayama* 12:293-301 (1958).
- * OGATA, T.: "A histochemical study of the red and white muscle fibres. I. Activity of the succinoxidase system in muscle fibres". *Acta. Med. Okay.* 12:216-227 (1958a).
- * OGATA, T.: "A histochemical study of the red and white muscle fibres. II. Activity of the cytochrome oxidase in muscle fibres". *Acta. Med. Okay.* 12:228-232 (1958b).
- * OGATA, T.: "A histochemical study of the red and white muscle fibres. III. Activity of the diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase in muscle fibres". *Acta Med. Okay.* 12:233 (1958c).
- * OGATA, T.: "A histochemical study on the structural differences of motor end-plate in the red, white and intermediate muscle fibers of mouse limb muscle". *Act. Med. Okayama.* 19:149-153 (1965).
- * OGATA, T.: "Structure of motor end-plate in the different fiber types of vertebrates skeletal muscles". *Arch. Histol. Cytol.* 51:385-424 (1988).
- * OGATA, T., HONDO, T. y SEITO, T.: "An electron microscopic study on differences in the fine structures of motor end-plate in red, white and intermediate muscle fibers of rat intercostal muscle. A preliminary study". *Act. Med. Okayama.* 21:327-338 (1967).
- * OGATA, T. y MURATA, F.: "Fine structure of motor end-plate in red, white and intermediate fibers of mammalian fast muscle". *Tohoku J. Exp. Med.* 98:107-115 (1969a).
- * OGATA, T. y MURATA, F.: "Cytological features of three fiber types in human striated muscle". *Tohoku J. Exp. Med.* 99:225 (1969b).
- * OGATA, T. y YAMASAKI, Y.: "Scanning electron microscope studies on the Schwann cells in rat motor endplates with special reference to their finger-like projection". *Arch. Histol. Jap.* 47:533-539 (1984).
- * OGATA, T. y YAMASAKI, Y.: "The three-dimensional structure of motor end-plates in different fiber types of rat intercostal muscle. A scanning electron-microscopic study". *Cell Tiss. Res.* 241:465-472 (1985).
- * OGATA, T. y YAMASAKI, Y.: "High-resolution scanning electron-microscopic studies on the three-dimensional structure of mitochondria and sarcoplasmic reticulum in the different twitch muscle fibers of the frog". *Cell Tissue Res.* 250:489-497 (1987).
- * ONTELL, M.: "Muscle satellite cells: a validated technique for light microscopic identification and a quantitative study of changes in their population following denervation". *Anat. Rec.* 178:211-228 (1974).
- * ONTELL, M. y DUNN, R.F.: "Neonatal muscle growth: a quantitative study". *Am. J. Anat.* 152:539-556 (1978).
- * ONTELL, M., BOURKE, D. y HUGHES, D.: "Cytoarchitecture of the fetal murine soleus muscle". *Am. J. Anat.* 181:267-278 (1988).
- * ORDAHL, C.P. y Le DOUARIN, N.M.: "Two myogenic lineages within the developing somite". *Development* 114:339-353 (1992).

- * OSCAI, L.B. y HOLLOSZY, J.O.: "Biochemical adaptations in muscle. II. Response of mitochondrial adenosine triphosphatase, creatinine phosphokinase, and adenylate kinase activities in skeletal muscle to exercise". *J. Biol. Chem.* 246: 6968-9672 (1971).
- * OUDET, C.L. y PETROVIC, A.G.: "Regulation of the anatomical length of the lateral pterygoid muscle in the growing rat". *Adv. Physiol. Sci.* 24:115-121 (1981).
- * OVALLE, W.K.: "Fine structure of rat intrafusal muscle fibres. The equatorial region". *J. Cell Biol.* 52:382-396 (1972a).
- * PADYKULA, H.A. y GAUTIER, G.F.: "Morphological and cytochemical characteristics of fiber types in normal mammalian skeletal muscle". En: Milhorat AT. Ed. *Exploratory concepts in muscular dystrophy and related disorders*, Internat Congr. Series n° 147, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, pp 117-131 (1967).
- * PADYKULA, H.A. y GAUTHIER, G.F.: "The ultrastructure of the neuromuscular junctions of mammalian red, white and intermediated skeletal muscle fibers". *J. Cell Biol.* 46:27-41 (1970).
- * PAGE S.G.: "Structure and some contractile properties of fast and slow muscles of the chicken". *J. Physiol. London* 205:131-145 (1969).
- * PAGE, S.G. y HUXLEY, H.E.: "Filament lengths in striated muscle". *J. Cel. Biol.* 19:369 (1963).
- * PALADE, G.E.: "Electron microscope observations of interneural and neuromuscular synapses". *Anat. Record.* 118:335-336 (1954).
- * PALAY, S.L.: "The morphology of synapses in the central nervous system". *Exptl. Cell Res. Suppl.* 5:275-293 (1958).
- * PALMER, S. y KENTISH, J.C.: "The role of troponin C in modulating the Ca^{2+} sensitivity of mammalian skinned cardiac and skeletal muscle fibres". *J. Physiol. Lond.* 480:45-60 (1994).
- * PAMPHLETT, R. y cols.: "Needle muscle biopsy: will it make open biopsy obsolete?". *Aust. Nz. J. Med.* 15:199-202 (1985).
- * PANTE, N. y AEBI, U.: "The nuclear pore complex". *J. Cell Biol.* 122:977-984 (1993).
- * PAPADOPOULOS, S., JURGENS, K.D. y GROS, G.: "Diffusion of myoglobin in skeletal muscle cells-dependence on fibre type, contraction and temperature". *Pflugers Arch.* 430:519-525. (1995).
- * PAPPENHEIMER, J.R., RENKIN, E.M. y BORRERO, L.M.: "Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes. A contribution to the pore theory of capillary permeability". *Am. J. Physiol.* 167:13-46 (1951).
- * PARDO, J.V., D'ANGELO SILICIANO, J. y CRAIG, S.W.: "A vinculin-containing cotical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements (costameres) mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma". *Proc. Nat. Acad. Sc. (USA)* 80:1008 (1983).
- * PAUL, M.H. y SPERLING, E.: "the cyclophorase system: correlation of cyclophorase activity and the mitochondrial density in striated muscle". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 79:352 (1952).
- * PAVLATH, G.K. y cols.: "Localization of muscle gene products in nuclear domains". *Nature Lond.* 337:570-573 (1989).
- * PEACHEY, L.D.: "The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius". *J. Cell Biol.* 25:209 (1965).
- * PERLASAMY, M.E. y cols.: "Fast skeletal muscle myosin light chains 1 and 3 are produced from a single gene by a combined process of differential RNA transcription and splicing". *J. Biol. Chem.* 259:13595-13604 (1984).
- * PERRY, S.V. y CORSI, A.: "Extraction of proteins other than myosin from isolated rabbit myofibril". *Biochem. J.* 68:5 (1958).
- * PETER, J.B. y cols.: "Lactate dehydrogenase isoenzymes: distribution in fast-twitch red, fast-twitch white, and slow-twitch intermediate fibers of ginea pig skeletal muscle". *Arch. Biochem. Biophys.* 144:304-307 (1971).

- * PETER, J.B. y cols.: "Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits". *Biochem.* 11:2627 (1972).
- * PETTE, D. y STARON, R.S.: "Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers". *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 116:1-76 (1990).
- * PFUHL, M., WINDER, S.J. y PASTORE, A.: "Nebulin, a helical actin binding protein". *EMBO J.* 13:1782-1789 (1994).
- * PHELAN, J.N. y GONYEA, W.J.: "Effect of radiation on satellite cell activity and protein expression in overloaded mammalian skeletal muscle". *Anat. Rec.* 247:179-188 (1997).
- * PHILLIPS, G.N., FILLERS, J.P. y COHEN, C.: "Tropomyosin crystal structure and muscle regulation". *J. Mol. Biol.* 192:111-131 (1986).
- * PIEHL, K., ADOLFSSON, S. y NAZAR, K.: "Glycogen storage and glycogen synthetase activity in trained and untrained muscle of man". *Acta Physiol. Scand.* 90:779-788 (1974).
- * PIEROBON-BORMIOLI, S.: "Fast isomyosins and fiber types in mammalian skeletal muscle". *J. Histochem. Cytochem.* 29:1179-1188 (1981).
- * PLAGHKI, L.: "Régénération et myogenèse du muscle strié". *J. Physiol.* 80:51-110 (1985).
- * POMEROY, M.E. y cols.: "Distribution of myosin heavy chain mRNA in embryonic muscle tissue visualized by ultrastructural in situ hybridization". *Dev. Biol.* 143:58-67 (1991).
- * POOLE, D.C. y MATHIEU-COSTELLO, O.: "Relationship between fiber capillarization and mitochondrial volume density in control and trained rat soleus and planteris muscles". *Microcirc.* 3:175-186 (1996).
- * PORTER, G.A. y cols.: "Two populations of beta-spectrin in rat skeletal muscle". *Cell Motil. Cytoskeleton* 37:7-19 (1997).
- * PORTER, J.D. y BAKER, R.S.: "Prenatal morphogenesis of primate extraocular muscle: neuromuscular junction formation and fiber type differentiation". *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33:657-670 (1992).
- * PRAKASH, Y.S. y cols.: "Morphology of diaphragm neuromuscular junctions on different fibre types". *J. Neurocytol.* 25:88-100 (1996).
- * PRAMPERO, P.E.: "Fibras musculares de contracción lenta y rápida". *Sport Med.* 2:15-23 (1990).
- * PRICE, H.M., HOWES, E.L. y BLUMBERG, J.M.: "Ultrastructural alternations in skeletal muscle fibers injured by cold. II. Cells of the sarcolemmal tube: observations on 'discontinuous' regeneration and myofibril formation". *Lab. Invest.* 13:1279 (1964).
- * PRICE, M. y GOMER, R.: "Skelemin, a cytoskeletal M-disc periphery protein, contains motifs of adhesion/recognition and intermediate filaments proteins". *J. Biol. Chem.* 268:21800-21810 (1993).
- * PRZYBYLSKI, R.J.: "Occurrence of centrioles during skeletal and cardiac myogenesis". *J. Cell Biol.* 48:214-221 (1971).
- * PRZYBYLSKI, R.J. y BLUMBERG, J.M.: "Ultrastructural aspects of myogenesis in the chick". *Lab. Invest.* 15:836 (1966).
- * PUZO, J. y COLS.: "Perfil lipoproteico en corredores de fondo, ciclistas y karatecas". *Hipertens. Arterioscl.* 4:145-148 (1989).
- * RABERGER, E.: "Innervationsunterschiede zwischen roten und weissen Muskelfasern der rat". *Verh. Anat. Ges.* 66:431-434 (1971).
- * RAHKILA, P. y cols.: "Endoplasmic reticulum to Golgi trafficking in multinucleated skeletal muscle fibers". *Exp. Cell Res.* 234:452-464 (1997).
- * RANTANEN, J., RISSANEN, A. y KALIMO, H.: "Lumbar muscle fiber size and type distribution in normal subjects". *Eur. Spine J.* 3:331-335 (1994).
- * RANVIER, L.: "Propriétés et structures différentes des muscles rouges et des muscles blancs chez les lapin et chez les raies". *Comp. Rend. Hebd. Séances de l'Académie des Sciences (Paris)*. 77:1030 (1873).
- * RANVIER, L.: "Note sur les vaisseaux sanguine et la circulation dans muscles rouges". *C. R. Hebd. Seances Mem. Soc. Biol.* 26:28-31 (1874a).

- * RANVIER, L.: "De quelques faits relatifs à l'histologie et à la physiologie des muscles striés". *Arch. Physiol.* 6:1 (1874b).
- * RANVIER, L.: "Leçons d'Anatomie Générale sur les Systèmes Musculaires". Paris: De La Haye (1880).
- * RAYNS, D.G., DEVINE, C.E. y SUTHERLAND, C.L.: "Freeze-fracture studies of membrane systems in vertebrate muscle. I. Striated muscle". *J. Ultrastruct. Res.* 50:306-321 (1975).
- * REGER, J.F.: "Electron micrographs of neuromuscular synapses from mammalian (albino mice) and amphibian (*Rana pipiens*) gastrocnemii muscles". *Ibid.* 128:608-609 (1957).
- * REGER, J.F.: "Electron microscopy of the motor end-plate in intercostal muscle of the rat". *Anat. Rec.* 118:344 (1954).
- * REGER, J.F.: "Electron microscopy of the motor end-plate in rat intercostal muscle". *Ibid.* 122:1-15 (1955).
- * REGER, J.F.: "The fine structure of neuromuscular synapses of gastrocnemii from mouse and frog". *Ibid.* 130:7-24 (1958).
- * REICHMANN, H. y PETTE, D.: "A comparative microphotometric study of succinate dehydrogenase activity levels in type I, IIA and IIB fibres of mammalian and human muscles". *Histochem.* 74:27-41 (1982).
- * RENKIN, E.M. y cols.: "Heterogeneity capillary distribution and capillary circulation in mammalian skeletal muscles". *Symposium on O₂ transport. Underwater Physiology Proc. 7th Symp.*, editado por A.J. Bachrach y M. Matzen. Bethesda, MD: Undersea Med. Soc., p. 465-474 (1981).
- * RETZIUS, G.: "Muskelfibrille und Sarkoplasma". In *Biologische Untersuchungen. Neue Folge*, 2 pp.81. Stockholm (1890).
- * ROBBINS, J. y cols.: "The chicken myosin heavy chain family". *J. Biol. Chem.* 261:6606-6612 (1986).
- * ROBERT, B. y cols.: "A single locus in the mouse encodes both myosin light chains 1 and 3, a second locus corresponds to a related pseudogene". *Cell* 39:129-140 (1984).
- * ROBERTSON, J.D.: "The ultrastructure of a reptilian myoneural junction". *Ibid.* 123:381-394 (1956).
- * ROBERTSON, T.A., PAPADIMITRIOU, J.M. y GROUNDS, M.D.: "Fusion between a myogenic cell in the satellite cell position and undamaged adult myofibre segments". *Experientia* 48:394-395 (1992).
- * ROBINSON, D.M. y cols.: "Increase peak oxygen consumption of trained muscle requires increased electron flux capacity". *J. Appl. Physiol.* 77:1941-1952 (1994).
- * ROMANUL, F.C.A. y POLLOCK, M.: "The parallelism of changes in oxidative metabolism and capillary supply of skeletal muscle fibers". In: *Modern Neurology*, editada por S. Locke. Boston, MA: Little, Brown, p. 203-214 (1969).
- * ROMEI, B.: "Taschenbuch der mikroskopischen Technik". 12th Ed. Oldenbourg, Munich. (1928).
- * ROSSER, B.W. y COLS.: "Myosin heavy chain expression within the tapered ends of skeletal muscle fibers". *Anat. Rec.* 242:462-470 (1995).
- * ROUGET, M.: "Note sur la terminaison des nerfs moteurs dans les muscles chez les reptiles, les oiseaux et les mammifères". *Compt. Rend.* 55:548-551 (1862).
- * ROUND, J.M., MATTHEWS, Y. y JONES, D.A.: "A quick simple and reliable method for ATPase in human muscle preparations". *Histochemical Journal* 12: 707-709 (1980).
- * ROWE, A.J.: "The contractile proteins of skeletal muscle". *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 160:437 (1964).
- * ROWE, R.W.D., GOLDSPINK, G.: "Muscle fiber growth in the five different muscles in both sexes of mice". I. Normal mice. *J. Anat.* 104:519-530 (1969).
- * ROY, R.R. y cols.: "Functional significance of compensatory overloaded skeletal muscle". *J. Appl. Physiol.* 52:473-478 (1982).

- * RUBINSTEIN, N.A. y KELLY, A.M.: "Development of muscle fiber specialization in the rat hindlimb". *J. Cell Biol.* 90:128-144 (1981).
- * RUFF, R.L.: "Sodium channel slow inactivation and the distribution of sodium channels on skeletal muscle fibres enable the performance properties of different skeletal muscle fibre types". *Acta Physiol. Scand.* 156:159-168 (1996).
- * RUSHTON, W.A.H.: "A theory of the effects of fibre size in medullated nerve". *J. Physiol. London* 115:101-122 (1951).
- * RUSSELL, B., WENDROTH, M.P. y GOLDSPINK, P.H.: "Remodeling of myofibrils subcellular distribution of myosin heavy chain mRNA and protein". *Am. J. Physiol.* 262:339-345 (1992).
- * SAHLIN, K. y COLS.: "Phosphocreatine content in single fibers of human muscle after sustained submaximal exercise". *Am. J. Physiol.* 273:172-178 (1997).
- * SAKUMA, K. y COLS.: "Ultrastructural changes of collagen fibers in the anterior cruciate ligament of bipedal rats after enforced running" *Nippon Seik. Gakkai Zasshi* 67:655-661 (1993).
- * SALTIN, B. y cols.: "The nature of the training response; peripheral and central adaptations to one-legged exercise". *Acta Physiol. Scand.* 96:289-305 (1976).
- * SALTIN, B. y cols.: "Fiber types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary man and endurance runners". *Ann. NY Acad. Sci.* 301:3-29 (1977).
- * SALTIN, B. y ROWELL, L.B.: "Functional adaptations to physical activity and inactivity". *Fed. Proc.* 39:1506-1513 (1980).
- * SALVIATI, G. y cols.: "Myofibrillar-protein isoforms and sarcoplasmic-reticulum Ca^{2+} -transport capacity of single human muscle fibres". *Biochem. J.* 224:215-225 (1983).
- * SANTA, T. y ENGEL, A.G.: "Histometric analysis of neuromuscular junction ultrastructure in rat red, white and intermediate muscle fibers". In: *Developments in electromyography and clinical neurophysiology*, edited by J.E. Desmedt. Basel: Karger, vol. 1:41-54 (1973).
- * SANTANA-PEREIRA, J.A. y cols.: "New method for the accurate characterization of single human skeletal muscle fibres demonstrates a relation between mATPase and MyHC expression in pure and hybrid fibre types". *J. Muscle Res. Cell Motil.* 16:21-34 (1995).
- * SANTANA-PEREIRA, J.A. y COLS.: "Myosin heavy chain isoform expression and high energy phosphate content in human muscle fibres at rest and post-exercise". *J. Physiol. Lond.* 496:583-588 (1996).
- * SARTORE, S. y cols.: "Fibre types in extraocular muscle: a new myosin isoform in the fast fibres". *J. Muscle Res. Cell Motil.* 8:161-172 (1987).
- * SARTORELLI, L. y cols.: "Direct and O^{18} -exchange measurements relevant to possible activated or phosphorylated states of myosin". *Biochemistry* 5:2877-2884 (1966).
- * SATO, T. y cols.: "Age changes in myofibrils of human minor pectoral muscle". *Mech. Ag. Dev.* 34:297-304 (1986).
- * SAUBER, C.W. y cols.: "Anaerobic enzyme adaptations to sprint training in rats". *Pfluegers Arch.* 341:305-312 (1973).
- * SCHAFER, D.A., HUG, C. y COOPER, J.A.: "Inhibition of CapZ during myofibrillogenesis alters assembly of actin filaments". *J. Cell Biol.* 128:61-70 (1995).
- * SCHAFER, D.A. y cols.: "Differential localization and sequence analysis of capping protein β -subunit isoforms of vertebrates". *J. Cell Biol.* 127:453-465 (1994).
- * SCHEER, U., THIRY, M. y GOESSENS, G.: "Structure, function and assembly of the nucleolus". *Trends Cell Biol.* 3:236-241 (1993).
- * SCHIAFFINO, S. y cols.: "Differentiation of fibre types in rat skeletal muscle visualized with monoclonal antimyosin antibodies". *J. Muscle Res. Cell Motil.* 6:60-61 (1985).
- * SCHIAFFINO, S. y cols.: "Embryonic and neonatal myosin heavy chain in denervated and

- paralyzed rat skeletal muscle". *Dev. Biol.* 127:1-11 (1988).
- * SCHIAFFINO, S., BORMIOLI, S.P. y ALOISI, M.: "The fate of newly formed satellite cells during compensatory muscle hypertrophy". *Wircnows Arch. B.* 21:113-118 (1976).
- * SCHIAFFINO, S., HANZLIKOVÁ, V. y PIEROBON, S.: "Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers". *J. Cell Biol.* 47:107-119 (1970).
- * SCHIAFFINO, S. y REGGIANI, C.: "Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle". *J. Appl. Physiol.* 77:493-501 (1994).
- * SCHIAFFINO, S. y REGGIANI, C.: "Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance". *Physiol. Rev.* 76:371-423 (1996).
- * SCHIFF, U.: "Eine neue Reihe organischer Diamine". *Justus Leibigs Annin Chem.* 140:92-95 (1866).
- * SCHIPPEL, K. y REISSIG, D.: "Zur feinstruktur des Muskel-sehnenüberganges". *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 78:235-255 (1968).
- * SCHMALBRUCH, H.: "Die quergestreiften muskelfasern des menschen". *Ergebn. Anat. Entwickl. Gesch.* 43:1-75 (1970).
- * SCHMALBRUCH, H.: "Satellite cells of the rat muscles as studied by freeze-fracturing". *Anat. Rec.* 191:371-376 (1978).
- * SCHMALBRUCH, H. y HELLHAMMER, U.: "The number of satellite celles in normal human muscle". *Anat. Rec.* 185:279-288 (1976).
- * SCHMALBRUCH, H. y HELLHAMMER, U.: "The number of nuclei in adult rat muscles with special reference to satellite cells". *Anat. Rec.* 189:169-176 (1977).
- * SCHRÖDER, J.M., KEMME, P.T. y SCHOLZ, L.: "The fine structure of denervated and reinnervated muscle spindles: morphometric study of intrafusar muscle fibers". *Acta Neuropathol.* 46:95-106 (1979).
- * SCHULTZ, E.: "A quantitative study of the satellite cell population in postnatal mouse lumbrical muscle". *Anat. Rec.* 180:589-596 (1974).
- * SCHULTZ, E.: "Fine structure of satellite cells in growing skeletal muscle". *Am. J. Anat.* 147:49-70 (1976).
- * SCHULTZ, E.: "A quantitative study of satellite cells in regenerated soleus and extensor digitorum longus muscles". *Anat. Rec.* 208:501-506 (1984).
- * SCHULTZ, E. y Cols.: "Survival of satellite cells in whole muscle transplants". *Anat. Rec.* 222:12-17 (1988).
- * SCHULTZ, G.A. y KARLSSON, U.: *En Técnicas en microscopía electrónica en biología.* Santander. R.G. Ed. Aguilar pp.666 (1968).
- * SEMENOFF, W.E.: "Mikrochemische Bestimmung der Aktivität der Succinodehydrase in den Organen der *Rana temporaria*". *Zeit. Zellf.* 22:305 (1935).
- * SHAFIQ, S.A., GORYCKI, M.A. y MAURO, A.: "Mitosis during postnatal growth in skeletal and cardiac muscle of the rat". *J. Anat.* 103:135-141 (1968).
- * SHAFIQ, S.A. y cols.: "Fine structure of fiber types in normal human muscle". *Anat. Rec.* 156:283 (1966).
- * SHAFIQ, S.A. y cols.: "Fine structure of aging skeletal muscle". *En: Aging and Cell Structure.* pp. 333-346. Ed. J.E. Johnson. New York (1981).
- * SHEAR, C.R. y GOLDSPIK, G.: "Structural and physiological changes associated with the growth of avian fast and slow muscle". *J. Morphol.* 135:351-372 (1971).
- * SHOTTON, D.M.: "Quantitative freeze-fracture electron microscopy of dystrophic muscle membranes". *J. Nerol. Sc.* 57:161 (1982).
- * SHRIVER, J.W.: "The structure of myosin and its role in energy transduction in muscle". *Biochem. Cell Biol.* 64:265-276 (1986).
- * SIECK, G.C. y PRAKASH, Y.S.: "Morphological adaptations of neuromuscular junctions depend on

- fiber type". *Can. J. Appl. Physiol.* 22:197-230 (1997).
- * SILLAU, A.H. y BANCHERO, N.: "Skeletal muscle fiber size and capillarity". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 158:288-291 (1978).
- * SINACORE, D.R. y COLS.: "Type II fiber activation with electrical stimulation: a preliminary report". *Phys. Ther.* 70:416-422 (1990).
- * SIPILA, S. y COLS.: "Effects of strength and endurance training on muscle fibre characteristics in elderly women". *Clin. Physiol.* 17:459-474 (1997).
- * SISSONS, H.A.: "Anatomy of the motor unit". In: *Disorders of voluntary muscle* (Walton, J.N. ed.). pp. 1-16, Churchill: London (1969).
- * SJÖDIN, B.: "Lactate dehydrogenase in human skeletal muscle". *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 436:5-32 (1976).
- * SJOGAARD, G.: "Capillary supply and cross-sectional area of slow and fast twitch muscle fibres in man". *Histochem.* 76:547-555 (1982).
- * SJOGAARD, G.: "Water and electrolyte fluxes during exercise and their relation to muscle fatigue". *Acta Physiol. Scand.* 128:129-136 (1986).
- * SJOGAARD, G.: "Muscle energy metabolism and electrolyte shifts during low-level prolonged static contraction in man". *Acta. Physiol. Scand.* 134:181-187 (1988).
- * SJOGAARD, G. y McCOMAS, A.J.: "Role of interstitial potassium". *Adv. Exp. Med. Biol.* 384:69-80 (1995).
- * SJÖSTRÖM, M. y SQUIRE, J.: "Fine structure of the A-band in cryo-sections. The structure of the A-band in ultra-thin cryo-sections negatively stained". *J. Mol. Biol.* 109:49 (1977).
- * SJÖSTRÖM, M., ÅNGQUIST, K.A. y RAIS, O.: "Intermittent claudication and muscle fiber fine structure: Correlation between clinical and morphological data". *Ultrastruc. Pathol.* 1:309-326 (1980).
- * SJÖSTRÖM, M. y cols.: "Z- and M-band appearance in different histochemically defined types of human skeletal muscle fibers". *J. Histochem. Cytochem.* 30:1-11 (1982a).
- * SJÖSTRÖM, M., FRIDÉN, J. y EKBLOM, B.: "Fine structural details of muscle fibres after fibre type specific glycogen depletion". *Histochemistry* 76:425-438 (1982b).
- * SJÖSTRÖM, M. y cols.: "Human skeletal muscle metabolism and morphology after temporary incomplete ischemia". *Eur. J. Clin. Invest.* 12:69-79 (1982c).
- * SJÖSTRÖM, M., FRIDÉN, J. y EKBLOM, B.: "Endurance, what is it? Muscle morphology after an extremely long distance run". *Acta. Physiol. Scand.* 130:513-520 (1987).
- * SJÖSTRÖM, M., JOHANSSON, C. y LORENTZON, R.: "Muscle pathomorphology in m. quadriceps of marathon runners. Early signs of strain disease or functional adaptation?". *Acta Physiol. Scand.* 132:537-542 (1988).
- * SKUBISHAK, L.: "Distribution of myosin heads on the surface of vertebrate skeletal muscle thick filaments". *Biofizika* 41:695-703 (1996).
- * SMERDU, V. y cols.: "Type Iix myosin heavy chain transcripts are expressed in type Iib fibers of human skeletal muscle". *Am J. Physiol.* 267 (Cell Physiol. 36):C1723-1728 (1994).
- * SNOW, M.H.: "Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. I. A fine structural study". *Anat. Rec.* 188:181-199 (1977a).
- * SNOW, M.H.: "Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. II. An autoradiographic study". *Anat. Rec.* 188:200-218 (1977b).
- * SNOW, M.H.: "A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse". *Anat. Rec.* 207:593-604 (1983).
- * SOSA, H. y cols.: "Ultrastructure of skeletal muscle fibers studied by a plunge quick freezing method: myofilament lengths". *Biophys. J.* 67:283-292 (1994).

- * SPAMER, C. y PETTE, D.: "Activities of malate dehydrogenase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and fructose-1,6-diphosphatase with regard to metabolic subpopulations of fast- and slow-twitch fibres in rabbit muscles". *Histochem.* 60:9-19 (1979).
- * SPAMER, C. y PETTE, D.: "Activity patterns of phosphofructokinase, glyceraldehydephosphate, dehydrogenase, lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase in microdissected fast and slow fibres from rabbit psoas and soleus muscle". *Histochem.* 52:201-216 (1977).
- * SPECTOR, S.A. y cols.: "Muscle architecture and force-velocity characteristics of cat soleus and medial gastrocnemius: implications for motor control". *J. Neurophysiol.* 44:951-960 (1980).
- * SPURWAY, N.C.: "Interrrelationship between myosin-based and metabolism-based classifications of skeletal muscle fibre". *J. Histochem. Cytochem.* 29:87-88 (1981).
- * STARON, R.S.: "Human skeletal muscle fiber types: delineation, development and distribution". *Can. J. Appl. Physiol.* 22:307-327 (1997).
- * STARON, R.S., HIKIDA, R.S. y HAGERMAN, F.C.: "Reevaluation of human muscle fast-twitch subtypes: evidence for a continuum". *Histochem.* 78:33-39 (1983).
- * STARON, R.S. y cols.: "Human skeletal muscle fiber type adaptability to various workloads". *J. Histochem. Cytochem.* 32:146-152 (1984).
- * STARR, R., ALMOND, R. y OFFER, G.: "Location of C-protein, H-protein and X-protein in rabbit skeletal muscle". *J. Muscle Res. Cell Motil.* (1985).
- * STEIN, J.M. y PADYKULA, H.A.: "Histochemical classification of individual skeletal muscle fibres of the rat". *Am. J. Anat.* 110:103 (1962).
- * STEPHENS, H.R. y cols.: "Collagen types in neuromuscular diseases". *J. Neurol. Sc.* 53:45-62 (1982).
- * STICKLAND, N.C.: "The arrangement of muscle fibres and tendons in two muscles used for growth studies". *J. Anat.* 136:175-179 (1983).
- * STICKLAND, N.C. y GOLDSPIK, A.: "A possible indicator muscle for the fibre content and growth characteristics of porcine muscle". *Anim. Prod.* 16:135-146 (1973).
- * STICKLAND, N.C. y HANDEL, S.E.: "The numbers and types of muscle fibers in large and small breeds of pigs". *J. Anat.* 147:181-189 (1986).
- * STOCKDALE, F.E.: "Myogenic cell lineages". *Dev. Biol.* 154:284-298 (1992).
- * STRAUB, F.B.: "Actin" in *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged.* 2:3 (1942).
- * STUDITSKI, A.N., SEENE, T.P. y UMNOVA, M.M.: "Ultrastructural alterations in red muscle fibers of rat musculus quadriceps femoris during high motor activity". *Бюллетень Эк. Моск.* 10:492-494 (1985).
- * SUGIURA, T. y cols.: "Myosin heavy chain isoform transition in ageing fast and slow muscles of the rat". *Acta Physiol. Scand.* 144:419-423 (1992).
- * SUKHOVA, Z.I. y cols.: "The characteristics of the skeletal muscle fibers of the m. vastus lateralis in highly qualified skaters (A morphometric analysis)". *Arkh. Anat. Gistol. Embriol.* 100:59-64 (1991).
- * SUOMINEN, H., KIISKINEN, A. y HEIKKINEN, E.: "Effects of physical training on metabolism of connective tissues in young mice". *Act. Physiol. Scand.* 108:17-22 (1980).
- * SZCZESMA, D. y FAJER, P.G.: "The tropomyosin domain is flexible and disordered in reconstituted thin filaments". *Biochemistry* 34:3614-3620 (1995).
- * SZENT-GYÖRGI, A.: "Discussion". *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged* 1:67-71 (1941-42).
- * SZENT-GYÖRGI, A.: "Chemical physiology of contraction in body and heart muscle". *Academic Press, N.Y.* (1953).
- * TAAFFE, D.R. y COLS.: "Comparative effects of high- and low-intensity resistance training in thigh muscle strength, fiber area, and tissue

- composition in elderly women". *Cin. Physiol.* 16:381-392 (1996).
- * TABARY, J.C. y cols.: "Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization and different lengths by plaster casts". *J. Physiol.* 224:331-244 (1972).
- * TAKEKURA, H., KASUGA, N. y YOSHIOKA, T.: "Influences of sarcomere length and selective elimination of myosin filaments on the localization and orientation of triads in rat muscle fibres". *J. Muscle Res. Cell Motil.* 17:235-242 (1996).
- * TAKEKURA, H., SUN, X. y FRANZINI-ARMSTRONG, C.: "Development of the excitation-contraction coupling apparatus in skeletal muscle: peripheral and internal calcium release units are formed sequentially". *J. Muscle Res. Cell Motil.* 15:102-118 (1994).
- * TAKEMORI, S.; YAMAGUCHI, M. y UMAZUME, Y.: "Physiological significance of viscoelastic structures in myoplasm". *Adv. Biophys.* 33: 151-157 (1996).
- * TAMAKI, T. y cols.: "Morphological and biochemical evidence of muscle hyperplasia follows weight-lifting exercise in rats". *Am. J. Physiol.* 273:246-256 (1997).
- * TARDIEU, C., TABARY, J.C. y DE LA TOUR, E.H.: "Is sarcomere number adaptation different in young and in grown up animals". *Proc. Int. Congr. Physiol. Sci.*, 27th, vol 13. Paris (1977).
- * TARDIEU, C. y cols.: "Adaptation of sarcomere numbers to the length imposed on the muscle". *Adv. Physiol. Sci.* 24:99-114 (1981).
- * TAYLOR, A.W., THAYER, R. y RAO, S.: "Human skeletal muscle glycogen synthetase activities with exercise and training". *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 50:411-415 (1972).
- * TAYLOR, E.W.: "Mechanism of actomyosin ATPase and the problem of muscular contraction". *Crit. Rev. Biochem.* 6:103-164 (1979).
- * TAYLOR, L.D. y BANDMAN, E.: "Distribution of fast myosin heavy chain isoforms in thick filaments of developing chicken pectoral muscle". *J. Cell Biol.* 108:533-542 (1989).
- * TELLO, J.F.: "Génesis de las terminaciones nerviosas motrices y sensitivas. I. En el sistema locomotor de los vertebrados superiores. Histogénesis muscular". *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid* 15:101-199 (1917).
- * TESCH, A. y KARLSSON, J.: "Muscle fiber types and size in trained and untrained muscles of elite athletes". *J. Appl. Physiol.* 59:1716-1720 (1985).
- * TESCH, P.A.; THORSSON, A. y FUJITSUKA, N.: "Creatine phosphate in fiber types of skeletal muscle before and after exhaustive exercise". *J. Appl. Physiol.* 66:1756-1759 (1989).
- * THOMAS, D.D. y cols.: "Submillisecond rotational dynamics of spin-labeled myosin heads in myofibrils". *Biophys. J.* 32:873-890 (1980).
- * THOMAS, R.C.: "Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells". *Physiol. Rev.* 52:563-594 (1972).
- * THORNELL, L.E., ERIKSSON, A. y EDSTRÖM, L.: "Intermediate filaments in human myopathies". In "Cell and Muscle Motility". Vol. 4, Ed. Dowben, R.M. y Shay, J.W. pp. 84-136. N.Y.: Plenum (1983).
- * THORNELL, L.E. y cols.: "Development of fiber types in human fetal muscle. An immunocytochemical study". *J. Neurol. Sciences* 66:107-115 (1984).
- * THORSTENSSON, A. y cols.: "Muscle strength and fiber composition in athletes and sedentary men". *Med. Sci. Sports* 9:26-30 (1977).
- * TIEGS, O.W.: "A study by degeneration methods of the innervations of the muscles of a lizard (Egernia)". *J. Anat.* 66:300-323 (1932).
- * TILTON, R.G., KILO, C. y WILLIAMSON, J.R.: "Pericyte-endothelial relationships in cardiac and skeletal muscle capillaries". *Microvasc. Res.* 18:325-335 (1979).
- * TOKUYASU, K.T., DUTTON, A.H. y SINGER, S.J.: "Immunoelectron microscopic studies of desmin (skeleton) localization and intermediate filament organization in chicken skeletal muscle". *J. Cell Biol.* 96:1727 (1983).

- * TSUGORKA, A.; RÍOS, E. y BLATTER, L.A.: "Imaging elementary events of calcium release in skeletal muscle cells". *Science* 269:1723-1726 (1995).
- * TURTO, H., LINDY, S. y HALME, J.: "Protocollagen proline hydroxylase activity in work-induced hypertrophy of rat muscle". *Am. J. Physiol.* 226:63-65 (1974).
- * ULLRICK, V.C. y cols.: "Fine structure of the vertebrate Z-disc". *J. Mol. Biol.* 115:61-74 (1977).
- * VANDEKERCKHOVE, J., BUGAISKY, G. y BUCKINGHAM, M.: "Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells". *J. Biol. Chem.* 261:1838-1843 (1986).
- * VANDEKERCKHOVE, J. y WEBER, K.: "The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle and rabbit slow skeletal muscle". *Differentiation* 14:123-133 (1997).
- * VAUGHAN, K.T. y cols.: "Molecular cloning of chicken myosin-binding protein (MyBP)H (86-kDa protein) reveals extensive homology with MyBP-C (C-protein) with conserved immunoglobulin C2 and fibronectin type III motifs". *J. Biol. Chem.* 268:3670-3676 (1993).
- * VENABLE, J.H.: "Morphology of the cells of normal, testosterone deprived and testosterone stimulated levator ani muscle". *Am. J. Anat.* 119:271-302 (1966).
- * VENABLE, J.H. y GOGGESHALL.: *En Técnicas en microscopía electrónica en biología*. Santander, R. G. ed. Aguilar pp.666 (1968).
- * VERATTI, E.: "Ricerca sulle fine struttura della fibra muscolare striata". *Mem. Reale Inst. Lombardo* 19:87 (1902).
- * VIGOREAUX, J.O.: "The muscle Z band: lessons in stress management". *J. Muscle Res. Cell Motil.* 15:237-255 (1994).
- * VILLALÓN, J.M. y LÓPEZ DE REGO, J.: "Fuerza muscular". *Selección* 2:24-30 (1989).
- * VIRU, M.: "Differences in effects of various training regimens on metabolism of skeletal muscle". *J. Sports Med. Phys. Fitness* 34:217-227 (1994).
- * VLLESTAD, N.K.; BLOM, P.C. y GRNNERD, O.: "Resynthesis of glycogen indifferent muscle fibre types after prolonged exhaustive exercise in man". *Acta Physiol. Scand.* 137:15-21 (1989).
- * WACHSTEIN, Y. y MEISEL, E.: "The distribution of demonstrable succinic dehydrogenase and of mitochondria in tongue and skeletal muscle". *J. Biochem. Cytol.* 1:483 (1955).
- * WAERHAUG, O. y KORNELIUSSEN, H.: "Morphological types of motor nerve terminals in rat hindlimb muscles, possibly innervating different muscle fiber types". *Z. Anat. Entw. Gesch.* 144:237-247 (1974).
- * WAGNER, R.: "Neue Untersuchungen über den Bau und die Endigung der Nerven und die Struktur der Ganglien". Verlag Leopold Voss, Leipzig, (1847).
- * WAKAYAMA, Y. y cols.: "Quantitative ultrastructural study of muscle satellite cells in Duchenne dystrophy". *Neurology.* 29:401-407 (1979).
- * WAKAYAMA, Y. y cols.: "Ultrastructural localization of alpha 1-syntrophin and neuronal nitric oxide synthase in normal skeletal myofiber, and their relation to each other and to dystrophin". *Acta Neuropathol. Berl.* 94:455-464 (1997).
- * WANG, K. y WRIGHT, J.: "Architecture of the sarcomere matrix of skeletal muscle: immunoelectron microscopic evidence that suggests a set of parallel inextensible nebulin filaments anchored at the Z line". *J. Cell Biol.* 107:2199-2112 (1988).
- * WANG, N. y cols.: "Muscle fiber types of women after resistance training-qualitative ultrastructure and enzyme activity". *Pflugers Arch.* 424:494-502 (1993).
- * WANG, Y.C. y RUBENSTEIN, P.A.: "Splicing of two alternative exon pairs in beta-tropomyosin pre-mRNA is independently controlled during myogenesis". *J. Biol. Chem.* 267:12004-12010 (1992).

- * WATSON, M.: *En Técnicas de microscopía electrónica en biología*. Santander, R.G. ed. Aguilar pp. 666 (1968).
- * WATSON, M.L.: "Further observations on the nuclear envelope of the animal cell". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 6:147 (1959).
- * WEEDS, A.G.: "Myosin: polymorphism and promiscuity". *Nature* 274:417-418 (1978).
- * WEIBEL, E.R.: "Stereological methods". Vol. I: *Practical methods for biological morphometry*. Acad. Press. London. New York. Toronto (1979).
- * WEIBEL, E.R., KISTLER, G. y SCHERLE, W.: "Practical stereological methods for morphometric cytology". *J. Cell Biol.* 30:23-30 (1966).
- * WEISMANN, A.: "Über das Wachsen der quergestreiften Muskeln nach Beobachtungen am Frosch". *Z. Rat. Med.* 10:263-284 (1861).
- * WHALEN, R.G.: "Contractile protein isozymes in muscle development: the embryonic phenotype". In: *Plasticity of Muscle*, editado por D. Pette. New York: de Gruyter, p.177-191 (1980).
- * WHALEN, R.G. y cols.: "Three myosin heavy-chain isozymes appear sequentially in rat muscle development". *Nature Lond.* 292:805-809 (1981).
- * WIDDOWSON, E.M.: "Harmony of growth". *Lancet*, i. 901-905 (1970).
- * WIGMORE, P. y cols.: "The parallel and paradoxically perpendicular orientation of myoblasts on artificial grooved surfaces". *J. Anat.* 187:241-242 (1995).
- * WIGMORE, P.M. y DUNGLISON, G.F.: "Clones of myoblasts fuse randomly with different fibre type in fetal mammalian muscle". *Proceedings of Keystone Symposia on Molecular Biology of Muscle Development*. 39 (1997).
- * WILLIAMS, P.E. y cols.: "The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle". *J. Anat.* 158:109-114 (1988).
- * WILLIAMS, P.E. y GOLDSPIK, G.: "Longitudinal growth of striated muscle fibres". *J. Cell. Sci.* 9:751-767 (1971).
- * WILLIAMS, P.E. y GOLDSPIK, G.: "Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle". *J. Anat.* 127:459-468 (1978).
- * WILLIAMS, P.E. y GOLDSPIK, G.: "Connective tissue changes in immobilized muscle". *J. Anat.* 138:343-350 (1984).
- * WILLIAMS, P.L. y WARWICK, R.: *Gray anatomía*. Ed. Salvat S.A. Barcelona (España) (1985).
- * YABLONKA-REUVENI, Z.: "Development and postnatal regulation of adult myoblasts". *Microsc. Res. Tech.* 30:366-380 (1995).
- * YAFFE, D. y SAXEL, O.: "Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle". *Nature* 270:725-727 (1977).
- * YAMAGUCHI, M. y cols.: "Fine structure of wide and narrow vertebrate muscle Z-lines: A proposed model and computer simulation of Z-line architecture". *J. Mol. Biol.* 184:621-644 (1985).
- * YAMAKI, T., BAEZ, S. y ORKIN, L.R.: "Microvasculature in open cremaster muscle of mouse". *Microcirculation I*, editado por J. Grayson y W. Zingg. New York: Plenum, p. 402-403 (1976).
- * YOUNG, R.B., GOLL, D.E. y STROMER, M.H.: "Isolation of myosin synthesizing polysomes from cultures of embryonic chicken myoblasts before fusion". *Dev. Biol.* 47:123-135 (1975).
- * ZAJAC, F.E.: "Muscle and tendon: properties, models, scaling, and application to biomechanics and motor control". *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 17:359-411 (1989).
- * ZHANG, Y. y SHAFIQ, S.A.: "A freeze-fracture study of postembryonic differentiation of latissimus dorsi muscles of the chicken". *J. Morphol.* 183:145-153 (1985).
- * ZWEIFEACH, B.W. y METZ, D.B.: "Selective distribution of blood through the terminal vascular bed of mesenteric structures and skeletal muscle". *Angiology*. 6:282-289 (1955).

